

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Ligandos asociados a moléculas HLA de clase I en infecciones
virales y trastornos autoinmunitarios**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Barriga Torrejón

Director

Daniel López Rodríguez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**LIGANDOS ASOCIADOS A MOLÉCULAS HLA DE
CLASE I EN INFECCIONES VIRALES Y TRASTORNOS
AUTOINMUNITARIOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

ALEJANDRO BARRIGA TORREJÓN

DIRECTOR

DANIEL LÓPEZ RODRÍGUEZ

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**LIGANDOS ASOCIADOS A MOLÉCULAS HLA DE
CLASE I EN INFECCIONES VIRALES Y TRASTORNOS
AUTOINMUNITARIOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

ALEJANDRO BARRIGA TORREJÓN

DIRECTOR

DANIEL LÓPEZ RODRÍGUEZ

MADRID, 2017

La presente tesis doctoral ha sido realizada en la Unidad de Procesamiento Antigénico del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección del Dr. Daniel López Rodríguez.

Tutora: Eva Batanero Cremades.

A mis padres, por hacer esto posible

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	1
II.	RESUMEN	5
III.	SUMMARY	9
IV.	INTRODUCCIÓN	13
1	La respuesta inmunológica.....	15
1.1	El sistema inmunológico	15
1.2	Células T	15
1.3	Moléculas del MHC de clase I.....	16
1.4	Procesamiento de antígenos por el MHC de clase I	18
1.5	Presentación de antígenos por moléculas del MHC de clase I a los CTLs. .	20
2	HLA-B*27: polimorfismo y asociación con las espondiloartropatías.....	22
2.1	Polimorfismo en HLA-B*27	22
2.2	Distribución geográfica del polimorfismo de HLA-B*27.....	23
2.3	Espondiloartropatías	24
3	Patógenos	26
3.1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	26
3.1.1	Ciclo de desarrollo	26
3.1.2	<i>C. trachomatis</i> y espondiloartropatías	27
3.2	Virus respiratorio sincitial humano.....	28
3.2.1	Estructura de HRSV.....	28
3.2.2	Genoma, replicación y transcripción viral	29
3.2.3	Patología e inmunología de HRSV	30
3.3	Virus de la hepatitis C.....	32
3.3.1	Estructura y ciclo biológico	32
3.3.2	Patogénesis.....	34
3.3.3	Inmunología de la infección por HCV	34
V.	OBJETIVOS	37
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
1	Cultivos celulares	43
1.1	Líneas celulares.	43

1.2	Cultivos celulares	43
1.3	Cultivo de HRSV	43
2	Reactivos y medios.....	44
2.1	Anticuerpos.	44
2.2	Péptidos sintéticos.	44
2.3	Soluciones y medios.	45
3	Ensayos de estabilidad de complejos péptido-MHC.	45
3.1	Ensayos de estabilidad de complejos péptido-HLA en líneas deficientes en TAP. 45	
3.2	Controles.....	46
4	Modelos muridos.....	47
4.1	Cepas.	47
4.2	Infecciones e inmunizaciones.	47
4.3	Preparación de suspensión de esplenocitos.....	48
5	ELISPOT	48
5.1	ELISPOT.	48
5.2	Marcaje de CD8.	49
6	Análisis bioinformático	49
7	Análisis estadístico.....	49
7.1	Prueba t de Student.	49
7.2	Prueba χ^2	50
7.3	Ajuste por regresión lineal.	50
VII.	RESULTADOS	51
1	La inmunodominancia de epítomos procedentes de la proteína NS5B de HCV depende del polimorfismo de HLA-B*27.....	53
1.1	Las características de unión del epítomo NS5B ₄₀₃₋₄₁₁ a los subtipos HLA-B*27:02 y -B*27:05 sugieren una explicación al reconocimiento diferencial de este epítomo en distintos pacientes.	53
1.2	La infección crónica por HCV en individuos HLA-B*27:02* deriva en una mutación en el residuo en P2 de NS5B ₄₀₃₋₄₁₁ que impide la unión eficiente a la molécula HLA.....	56
1.3	Los perfiles de unión de los diferentes epítomos de la proteína viral NS5B a los subtipos HLA-B*27:04 y -B*27:06 sugieren probables diferencias en la inmunodominancia de la respuesta inmunológica antiviral.....	57
2	Un motivo de anclaje mínimo común para los ligandos de las moléculas de la familia HLA-B*27.....	59
2.1	El análisis filogenético del grupo alélico HLA-B*27 permite la selección de diversos subtipos funcionalmente diferentes.	59

2.2	Los ligandos específicos de HRSV se unen a la molécula B*27:05 con un amplio rango de afinidades.....	60
2.3	El cambio Tyr59His en la subcavidad A del sitio de unión al antígeno induce una disminución moderada en la unión a HLA-B*27 de los ligandos de HRSV... ..	63
2.4	Los residuos C-terminales básicos, a diferencia de los apolares, reducen la unión a la molécula B*27:04 de los ligandos virales restringidos por HLA-B*27:05.. ..	64
2.5	Los ligandos de HRSV restringidos por HLA-B*27:05 con residuos no polares en PQ exhiben alta afinidad de unión a B*27:06.	65
2.6	Los péptidos virales con residuos C-terminales apolares muestran alta afinidad de unión al subtipo B*27:09.....	66
2.7	Los residuos no polares en PQ de los ligandos virales de alta afinidad a B*27:05 conservan la capacidad de unión a la molécula B*27:01.	67
2.8	Los aminoácidos hidrofóbicos C-terminales, como leucina e isoleucina, mantienen la capacidad de unión al subtipo B*27:02 de los ligandos de HRSV restringidos por HLA-B*27:05.....	68
2.9	El análisis global de la afinidad de los diferentes péptidos sintéticos con los diversos subtipos de HLA-B*27 sugieren un motivo peptídico mínimo para la unión de ligandos a moléculas de esta familia.	69
2.10	La pérdida de los motivos de anclaje adicionales en los péptidos de alta afinidad NP ₁₈₄₋₁₉₄ y NP ₁₉₅₋₂₀₅ afecta a la capacidad de unión de los análogos monosustituidos a varios subtipos de HLA-B*27.	70
2.11	Varios ligandos procedentes de diferentes virus validan el motivo de unión mínimo Arg/Lys-Arg-X _n -Ile/Leu/Met.	75
2.12	El patrón de estabilización de los péptidos unidos a las diferentes moléculas HLA-B*27 ofrece una relación funcional entre los diferentes alelos...79	
3	Los grupos transcripcionales de HRSV determinan la respuesta inmunológica antiviral mediada por HLA de clase I	80
3.1	Las moléculas HLA de clase I presentan una amplia variedad de ligandos procedentes de diversas proteínas de HRSV.	80
3.2	Los péptidos F ₂₂₉₋₂₃₉ , N ₃₁₅₋₃₂₃ y NS1 ₃₃₋₄₁ de HRSV detectados por espectrometría de masas son ligandos de alta afinidad para HLA-A*02:01.....	81
3.3	Los péptidos virales N ₃₀₆₋₃₁₄ y NS2 ₁₉₋₃₀ se unen con alta afinidad a la molécula HLA-B*07:02.....	82
3.4	El contenido en aminoácidos implicados en los motivos de anclaje no influye en el número de ligandos de HLA de clase I derivados de las proteínas virales.	83
3.5	El tamaño de las proteínas virales no influye en la cantidad de ligandos de HLA de clase I derivados de ellas.....	84
3.6	Los grupos transcripcionales de HRSV determinan la distribución de los ligandos por el proteoma viral.	85

3.7	Los ligandos virales de HLA-A*02:01, B*07:02 y B*27:05 detectados por espectrometría de masas generan respuestas específicas en ratones transgénicos para HLA de clase I.	86
3.8	Los grupos transcripcionales también determinan la respuesta de células T específica de HLA de clase I.....	89
3.9	La afinidad de unión de los ligandos de HRSV no influye en la capacidad de respuesta ni se ve afectada por la transcripción viral.....	90
3.10	El tamaño de las proteínas provenientes del grupo transcripcional 3' determina la inmunoprevalencia e inmunodominancia de la respuesta de clase I frente a HRSV.....	92
4	Mimetismo antigénico entre ligandos restringidos por HLA-B*27 procedentes de <i>Chlamydia trachomatis</i> y humanos	93
4.1	La inmunización de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 con DNAP ₂₁₁₋₂₂₁ genera células T capaces de reconocer específicamente DNAP ₂₁₁₋₂₂₃	93
4.2	Las células T provenientes de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 inmunizados con DNAP ₂₁₁₋₂₂₃ son capaces de reconocer específicamente tanto el péptido bacteriano DNAP ₂₁₁₋₂₂₁ como el ligando endógeno humano B27 ₃₀₉₋₃₂₀	95
4.3	Los péptidos bacterianos DNAP ₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP ₂₁₁₋₂₂₃ son incapaces de generar respuestas mediadas por IFN γ en ratones del haplotipo H-2 ^b	96
4.4	La reactividad cruzada entre el epítipo bacteriano DNAP ₂₁₁₋₂₂₃ y el ligando endógeno humano B27 ₃₀₉₋₃₂₀ se encuentra ausente en ratones transgénicos para HLA-B*27:05 de sexo femenino.	97
VIII.	DISCUSIÓN	99
1	El polimorfismo de las moléculas del MHC de clase I influye en la inmunodominancia de los epítipos virales	101
2	Relevancia de los motivos de anclaje mínimos comunes para HLA-B*27.....	105
3	Papel del gradiente transcripcional de los Mononegavirales en la inmunoprevalencia e inmunodominancia de las respuestas restringidas por HLA de clase I	109
4	Mimetismo antigénico entre ligandos de <i>Chlamydia trachomatis</i> y un ligando endógeno humano restringido por HLA-B*27	114
5	Discusión general.....	119
IX.	CONCLUSIONES.....	123
X.	BIBLIOGRAFÍA	127
XI.	ANEXO	145
	Publicaciones generadas durante esta tesis	147

I. ABREVIATURAS

AS	Espondilitis anquilosante
B2m	B2 microglobulina
BCR	Receptor de las células B
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocito T citotóxico
D.E.	Desviación estándar
DMEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAP	Primasa de DNA
DRiP	Producto ribosomal defectuoso
E.E.M.	Error estándar de la media
EBV	Virus de Epstein-Barr
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ERAP	Aminopeptidasa del RE
FBS	Suero bovino fetal
HCV	Virus de la hepatitis c
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRSV	Virus respiratorio sincitial humano
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
kDa	Kilodalton
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBS-T	Tween 20 en PBS
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidad formadora de placa
PLC	Complejo de carga del péptido
RE	Retículo endoplasmático
ReA	Artritis reactiva
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SpA	Espondiloartropatía

TAP	Transportador asociado al procesamiento antigénico
TCR	Receptor de las células T
UTR	Región no traducida

II. RESUMEN

Título: Ligandos asociados a moléculas HLA de clase I en infecciones virales y trastornos autoinmunitarios.

Las células T CD8⁺ identifican y eliminan células infectadas y tumorales a través del reconocimiento específico de péptidos procedentes de proteínas intracelulares unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA) de clase I. La presentación de estos ligandos peptídicos presentados por las moléculas HLA de clase I es fundamental para el control de múltiples infecciones virales, y también se ha involucrado en enfermedades de carácter autoinmunitario como las espondiloartropatías. En este contexto, el extraordinario polimorfismo existente en las moléculas HLA de clase I determina los ligandos peptídicos que se pueden unir a los diferentes subtipos, puesto que únicamente aquellos ligandos que presenten los residuos adecuados en posiciones concretas, que permiten la interacción con aminoácidos específicos de la molécula HLA, son capaces de unirse a cada subtipo de clase I particular.

Esta tesis se encuentra estructurada en cuatro secciones:

1. En el análisis de la respuesta mediada por células T CD8⁺ frente al virus de la hepatitis C (HCV) se habían descrito previamente tres epítomos procedentes de la proteína viral NS5B restringidos por HLA-B*27. En la presente tesis se ha llevado a cabo el análisis de la capacidad de unión de estos epítomos a cuatro subtipos de HLA-B*27 (HLA-B*27:02, -B*27:04, -B*27:05 y -B*27:06). Los resultados permitieron explicar el reconocimiento diferencial identificado entre individuos infectados por HCV que expresan los subtipos HLA-B*27:02 o HLA-B*27:05. Además, se determinó que el cambio en el motivo de anclaje principal de uno de los epítomos constituye una mutación de escape viral puesto que impide la unión efectiva a la molécula de clase I presentadora. Asimismo, los datos obtenidos permiten sugerir cambios en los perfiles de inmunodominancia en el contexto de los subtipos HLA-B*27:04 y HLA-B*27:06. Todos estos resultados son importantes en la selección de epítomos para vacunas globales, ya que indican que el polimorfismo en la familia HLA-B*27 puede influir de forma importante en las características de unión de los ligandos peptídicos.

2. El conocimiento actual acerca de la especificidad de unión de péptidos para los diferentes subtipos del grupo HLA-B*27 es aún limitado. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de estabilización de un conjunto homogéneo de nueve péptidos procedentes del virus respiratorio sincitial humano (HRSV) utilizando siete subtipos diferentes de HLA-B*27. Mediante estos ensayos se logró identificar un motivo de anclaje mínimo común, consistente en la secuencia Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Leu/Met, que permitiría la unión efectiva a la mayoría de subtipos de HLA-B*27. Dicha estructura fue confirmada utilizando péptidos sintéticos procedentes de otros virus. Estos resultados, fácilmente transferibles a otras familias y supertipos de HLA de clase I, serían relevantes para los estudios de respuestas de células T CD8⁺ contra patógenos y en el desarrollo racional de vacunas.

3. A pesar de la importancia de los diferentes elementos de procesamiento y presentación de antígenos en la respuesta inmunológica antiviral, aún se desconocen reglas generales que permitan describir cómo el sistema inmunológico selecciona

ligandos de HLA de clase I en diferentes virus individuales y/o familias virales. En este contexto, se analizó la respuesta inmunológica frente a un conjunto de dieciséis ligandos de HRSV restringidos por cinco moléculas de clase I distintas que se generaban en células infectadas con el virus. Para ello se llevaron a cabo ensayos de estabilización y de respuesta *ex vivo* en ratones transgénicos para las diferentes moléculas HLA de clase I que presentaban estos ligandos virales. El análisis de los resultados estableció que el gradiente en la transcripción de genes virales, el principal mecanismo de regulación de la expresión génica en el orden Mononegavirales del cual HRSV forma parte, determina tanto la inmunoprevalencia como la inmunodominancia de la respuesta inmunológica antiviral mediada por HLA de clase I. Los datos recogidos en esta memoria tienen importantes implicaciones en el estudio de la respuesta inmunológica y en el desarrollo de vacunas no sólo frente a HRSV sino frente a todos los miembros del orden Mononegavirales en los cuales opere el citado mecanismo de regulación génica.

4. En el contexto de las espondiloartropatías, un conjunto de enfermedades de carácter autoinmunitario fuertemente asociadas a la familia HLA-B*27, la hipótesis del péptido artrítico postula que un péptido bacteriano con homología por un ligando endógeno sería el que iniciase el daño autorreactivo. Previamente se habían descrito dos ligandos restringidos por HLA-B*27:05, de 11 y 13 aminoácidos respectivamente, procedentes de la bacteria *Chlamydia trachomatis*. Estos péptidos mostraban una considerable homología con un ligando endógeno humano que se había aislado en subtipos de HLA-B*27 asociados con las espondiloartropatías pero se encontraba ausente en los subtipos considerados protectores. Todos estos datos sugerían un posible mimetismo antigénico entre los ligandos bacterianos y el endógeno humano, por lo que se procedió a evaluar el reconocimiento inmunológico de estos péptidos estudiando la respuesta *ex vivo* en ratones transgénicos para HLA-B*27:05. Los resultados revelaron que la inmunización con el tridecámero es capaz de generar células T CD8⁺ específicas capaces de reconocer el ligando endógeno humano. Además, se determinó que esta reactividad cruzada únicamente se producía en ratones de sexo masculino. Esta es la primera vez que se describe mimetismo antigénico entre un ligando procedente de una bacteria artrítica y un ligando humano, hecho que podría ser importante en el estudio, prevención o tratamiento de las espondiloartropatías.

En resumen, esta memoria aporta datos sobre ligandos de HLA de clase I presentados que son relevantes en el conocimiento sobre los mecanismos de la respuesta inmunológica frente a diversos virus y en la patogénesis de las SpAs, y poseen importantes implicaciones en el diseño racional y evaluación de vacunas e inmunógenos.

III. SUMMARY

Title: Ligands associated to HLA class I molecules in viral infections and autoimmune diseases.

CD8⁺ T cells identify and kill tumor and infected cells through the specific recognition of intracellular protein-derived peptides bound to human class I major histocompatibility (HLA class I) molecules. HLA class I presentation of these peptide ligands is key for the control of various viral infections, and it has also been involved in autoimmune diseases like spondyloarthropathies (SpAs). In this context, the extraordinary polymorphism of HLA class I molecules determines the peptide ligands that can bind to the different subtypes, because just the ligands displaying the appropriate residues in the right positions, allowing the interaction with specific amino acids in the HLA molecule, can bind to each particular HLA class I subtype.

This thesis is organized in four sections:

1. In the analysis of CD8⁺ T cell response against hepatitis C virus (HCV), three HLA-B*27-restricted epitopes derived from NS5B viral protein had been identified. In the current thesis, the analysis of the binding of this epitopes to four different HLA-B*27 subtypes (HLA-B*27:02, -B*27:04, -B*27:05 y -B*27:06) has been carried out. The results allowed us to explain the different recognition identified in HLA-B*27:02 or -B*27:05-expressing HCV-infected individuals. In addition, the modification in the major anchor motif of one of these epitopes has been characterized as a viral escape mutation that prevents the optimal binding to the HLA class I molecule. Moreover, these data suggested changes in the immunodominance profile in HLA-B*27:04 and HLA-B*27:06 contexts. All these results are important in epitope screening for global vaccines, since they remark how HLA-B*27 family polymorphism could influence the ligand binding properties of HLA class I molecules.

2. Current knowledge about peptide binding specificity in different HLA-B*27 subtypes is still limited. Thus, stability assays using a uniform set of nine human respiratory syncytial virus (HRSV)-derived peptides in seven HLA-B*27 subtypes were carried out. Through these assays a minimal common anchor motif, consisting in the Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Leu/Met sequence, was identified. This structure would allow peptide binding to most of HLA-B*27 subtypes. Using different viruses-derived synthetic peptides these anchor motifs were confirmed. These results are easily applicable to other HLA class I families and supertypes, and they are relevant in studies of CD8⁺ T cell response against pathogens and vaccines rational design.

3. Despite the importance of different antigen processing and presentation elements in antiviral immune response, general rules describing how immune system chooses HLA class I ligands from different viruses and/or viral families are still unknown. In this context, immune response against sixteen HRSV-infected cells-derived ligands restricted by five different HLA class I molecules was analyzed. In order to achieve this aim, HLA class I complex stability and HLA class I-transgenic mice *ex vivo* response assays were conducted. The analysis showed that viral transcriptional gradient, the major gene expression regulatory mechanism of Mononegavirales order (which includes HRSV), determines both the immunoprevalence and immunodominance in HLA class I-restricted antiviral immune

response. These results have important implications in immune response studies and vaccine development, not only against HRSV but also against other Mononegavirales members where the above-mentioned gene expression regulatory mechanism works.

4. Regarding SpAs, a group of HLA-B*27-associated autoimmune disorders, the arthritogenic peptide hypothesis proposes the response against a bacterial-derived human-mimicking peptide as the autoreactive damage initiating mechanism. Previously, 11-mer and 13-mer HLA-B*27:05-restricted *Chlamydia trachomatis*-derived ligands had been defined. These peptides showed high homology with an endogenous human ligand that was identified in SpA-associated subtypes but not in non-associated subtypes. These data suggested antigenic mimicry between bacterial and human ligands, so evaluation of immune recognition of these peptides, analyzing HLA-B*27:05-transgenic mice *ex vivo* response, was carried out. The results determined that T cells raised against 13-mer chlamydial peptide could recognize the human endogenous ligand. Furthermore, this cross-reactivity was detected only in male mice. This is the first demonstration of antigenic mimicry between an arthritogenic bacteria-derived peptide and a human ligand, fact that could be relevant in the study, prevention and treatment of SpAs.

In summary, this thesis provides several key points about HLA class I ligands that are relevant in the knowledge about antiviral immune response mechanisms and SpA pathogenesis and that have important implications in vaccines and immunogens rational design and testing.

IV. INTRODUCCIÓN

1 LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

1.1 El sistema inmunológico

El sistema inmunológico es el conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos responsable de la defensa del organismo frente a lo ajeno, entendiendo como tal cualquier factor que altere la homeostasis tanto de origen interno (transformaciones tumorales) como externo (fundamentalmente patógenos como virus, bacterias, hongos o parásitos pero también agentes químicos o físicos).

En la mayoría de los animales, el sistema inmunológico se divide en dos subsistemas, el innato y el adaptativo. El sistema inmunológico innato se caracteriza por el desarrollo de respuestas inmunológicas rápidas que no reconocen estructuras específicas de los patógenos sino patrones moleculares y no producen memoria inmunológica (es decir, no generan un “registro” de la exposición al patógeno). En cambio, el sistema inmunológico adaptativo da lugar a respuestas lentas pero específicas de antígeno que generan memoria inmunológica cuya finalidad es activar más rápida y eficientemente los mecanismos protectores en futuras exposiciones ante el mismo agente agresor. Esta última cualidad es de la que se aprovechan las vacunas frente a agentes infecciosos.

El sistema inmunológico innato está formado por diversos tipos celulares como las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), los granulocitos, las células NK (células asesinas naturales en inglés) y las células dendríticas, así como varios tipos de moléculas entre las que cabe destacar las que conforman el sistema del complemento. En cambio, el sistema inmunológico adaptativo está formado básicamente por dos tipos celulares, las células B (o linfocitos B) y las células T (o linfocitos T), y entre sus moléculas existen proteínas de alta especificidad por sus ligandos como son los anticuerpos, el receptor de las células B (BCR por sus siglas en inglés) y el receptor de las células T (TCR por sus siglas en inglés).

1.2 Células T

Los linfocitos T son células de origen linfoide que maduran en el timo, en donde experimentan procesos de selección positiva y negativa que tienen como objetivo generar clones de células T maduras que no reaccionen frente a lo “propio” pero que sean capaces de reconocer lo “no propio”. El resultado del periplo de las células T por el timo es la generación de células T indiferenciadas (*naïve*), pero funcionalmente maduras, que expresan un TCR completamente reordenado y funcional. A partir de aquí, las células T indiferenciadas se distribuyen por diferentes localizaciones del organismo en donde pueda producirse el contacto del TCR con el antígeno preciso. Este reconocimiento específico del antígeno activa diversas vías de

señalización que inducen a las células T indiferenciadas a activarse y proliferar, momento en el que devienen en células T efectoras.

La maduración tímica da lugar a los dos grupos principales de células T, que se definen por la presencia en la superficie celular de los marcadores CD4 o CD8, respectivamente. La expresión de dichas moléculas en las células T maduras es mutuamente excluyente y su presencia en la superficie determina generalmente tanto el patrón de reconocimiento del TCR como las características funcionales de las células T que los portan. Por un lado, las células T CD8⁺ efectoras se denominan CTLs (linfocitos T citotóxicos, por sus siglas en inglés), reconocen normalmente péptidos cortos presentados por moléculas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad por sus siglas en inglés) de clase I y su función principal es reconocer y destruir células infectadas por parásitos intracelulares. Por otra parte, las células que expresan el marcador CD4 se denominan células T colaboradoras (células T_H, del inglés *helper*), reconocen habitualmente péptidos largos unidos a moléculas del MHC de clase II y su función es coordinar y regular la respuesta inmunológica para que sea lo suficientemente eficaz como para eliminar al agente extraño pero sin llegar a ser tan exacerbada que dañe al organismo.

Las células T colaboradoras, a su vez, se dividen en cuatro subtipos principales —T_H1, T_H2, T_H17 y T_{Reg}— atendiendo a su patrón de secreción de citoquinas y sus diferentes capacidades funcionales [1]. Las células T_H1 producen principalmente IFN γ y TNF α , y son necesarias para la inmunidad celular frente a virus y bacterias intracelulares. Las células T_H2 son importantes en la inmunidad humoral frente a parásitos extracelulares, actividad que realizan a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. Las células T productoras de IL-17 se denominan consecuentemente células T_H17 y son cruciales en la protección frente a patógenos extracelulares y en procesos inflamatorios que en ocasiones participan en trastornos autoinmunitarios. Finalmente, las células T_{Reg} colaboran en la regulación e inhibición de la respuesta inmunológica exacerbada para evitar daño autoinmunitario en tejidos propios, para lo cual es fundamental la secreción de las citoquinas inhibitorias TGFB e IL-10.

1.3 Moléculas del MHC de clase I

Las moléculas del MHC, en complejo con diferentes péptidos, son los ligandos naturales de los TCRs [2]. Estas moléculas se denominan en seres humanos HLA (antígeno leucocitario humano, en inglés) y en ratones se conocen como moléculas H-2. Existen dos tipos de moléculas del MHC, clase I y clase II, codificadas ambas por genes localizados en el cromosoma 6 en humanos y 17 en ratones en un locus que comprende además otros genes relevantes tanto en el procesamiento antigénico en particular como en el sistema inmunológico en general. A su vez, en humanos existen tres genes que codifican para moléculas del MHC de clase I, denominadas en humanos HLA-A, -B y -C, y tres conjuntos de genes para las del MHC de clase II, HLA-DR, -DP y -DQ.

Las moléculas del MHC de clase I son glicoproteínas transmembrana que se expresan en todas las células nucleadas del organismo. Son un heterodímero formado por una cadena pesada (o cadena α) polimórfica de 44kDa que se une de forma no covalente a una cadena ligera constituida por una pequeña proteína globular invariable de 12kDa, la B2 microglobulina (o B2m) (Figura 1A). La cadena pesada, a su vez, se estructura desde el extremo amino en tres dominios, denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, que se continúan por una región transmembrana y una pequeña cola citoplasmática [3]. El dominio $\alpha 3$, responsable de la interacción con la molécula CD8 de las células T [4], y la B2m se pliegan adoptando conformaciones similares a los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Por su parte, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ conforman el sitio de unión al antígeno, que es la estructura molecular en la cual se acomodan los péptidos presentados por las moléculas del MHC de clase I. Dicha estructura está formada por una superficie compuesta por ocho cadenas antiparalelas dispuestas en estructura de lámina β sobre las que reposan dos hélices α separadas, que conforman las paredes de la hendidura (Figura 1B) [5].

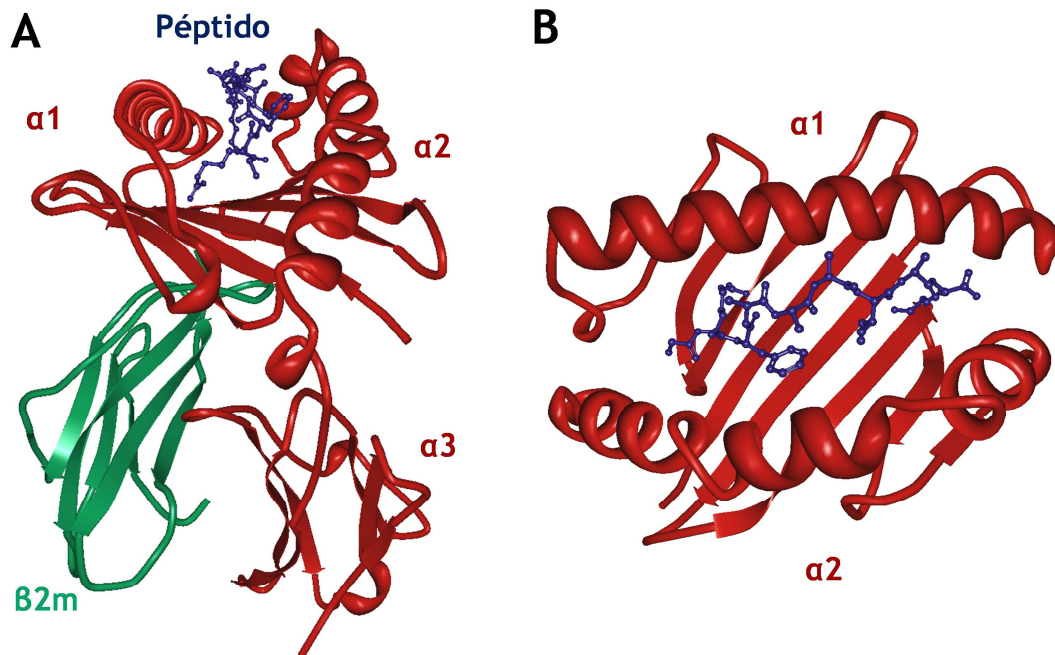


Figura 1. Estructura de las moléculas del MHC de clase I. **Panel A:** Vista lateral de la molécula del MHC de clase I HLA-B*27:05 unida a un péptido de nueve residuos. Se representan los tres dominios de la cadena pesada ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) en color rojo, la B2 microglobulina en color verde y el ligando peptídico en color azul. No se muestran las regiones transmembrana ni citoplasmática. **Panel B:** Vista cenital del sitio de unión al antígeno, formado por dos hélices α que reposan sobre la superficie de ocho cadenas β donde se acomoda el péptido.

Las moléculas del MHC de clase I vacías son altamente inestables y generalmente solo se expresan formando complejos con péptidos en la superficie celular [6]. Las moléculas del MHC de clase I unen ligandos peptídicos de habitualmente entre 8 y 10 aminoácidos en una conformación extendida y ligeramente flexible. La unión de los péptidos a las moléculas del MHC se estabiliza fundamentalmente por el contacto con ciertos residuos dentro del ligando, denominados motivos de anclaje, que interaccionan con el sitio de unión al antígeno.

De esta forma, los residuos situados en las hélices α y las cadenas β de la cadena pesada que se encuentran orientados hacia el interior del sitio de unión al antígeno conforman diferentes subcavidades o bolsillos cuya configuración determina la especificidad de los motivos de anclaje [7,8].

El sistema MHC es el locus más polimórfico que se conoce en mamíferos [9], con más de 12.000 alelos de clase I y de 4.000 de clase II descritos hasta la fecha en humanos (base de datos IPD - IMGT/HLA [10]). En las moléculas del MHC de clase I este polimorfismo se acumula fundamentalmente en las regiones $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que configuran el sitio de unión al péptido, afectando a las diferentes subcavidades que conforman el surco. De este modo, el polimorfismo del sistema MHC delimita la capacidad de unión a los diferentes ligandos en función de sus motivos de anclaje, lo que finalmente define la estructura del complejo péptido-MHC y determina el reconocimiento por el TCR de las células T [11-13].

1.4 Procesamiento de antígenos por el MHC de clase I

Los ligandos presentados por las moléculas del MHC de clase I son generados en la denominada vía clásica de procesamiento y presentación de antígenos de clase I, proceso que permite la presentación de péptidos derivados de proteínas endógenas que se ensamblan en complejos con las moléculas del MHC de clase I para ser expuestos en la superficie celular [14,15]. El conjunto de péptidos dispuestos de esta manera se denomina el ligandoma (o peptidoma) del MHC de clase I [16].

En condiciones normales el ligandoma del MHC de clase I está formado exclusivamente por péptidos derivados de proteínas celulares. Dichos péptidos proceden generalmente de dos fuentes distintas. Por un lado, algunos péptidos derivan de proteínas que se encuentran al final de su vida útil, cuyos aminoácidos deben ser reciclados para la síntesis de nuevas moléculas. Por otro, una fracción significativa de ligandos derivan de los denominados DRiPs (acrónimo para productos ribosomales defectuosos en inglés), que consisten en polipéptidos recién sintetizados que, ya porque su traducción termina prematuramente o porque se pliegan erróneamente, se degradan rápidamente antes de formar proteínas funcionales [17,18]. Aunque la célula se encuentra continuamente procesando y presentando péptidos provenientes de proteínas endógenas, cuando en el interior celular se expresan proteínas “no propias” como aquellas procedentes de patógenos intracelulares o de genes mutados (por ejemplo en cáncer), éstas también pueden ser procesadas para generar péptidos que se incluyan en el repertorio de los ligandos del MHC de clase I. De esta forma los péptidos antigénicos derivados de proteínas anómalas o de patógenos quedan expuestos para el reconocimiento específico por las células T CD8⁺ en la superficie celular.

El procesamiento de los antígenos comienza cuando las proteínas o cadenas polipeptídicas son degradadas en fragmentos más pequeños por la principal proteasa celular: el proteasoma [19-21]. Los proteasomas son grandes complejos enzimáticos formados por tres subunidades que se caracterizan por su coeficiente de

sedimentación: un núcleo proteolítico 20S flanqueado por dos complejos reguladores 19S que en conjunto forman el proteasoma 26S [22]. El núcleo 20S es un cilindro hueco formado por veintiocho subunidades distintas que se disponen en cuatro anillos superpuestos. Los dos anillos exteriores están formados por siete subunidades α ($\alpha 1 - \alpha 7$) mientras que los anillos interiores se componen por siete subunidades β ($\beta 1 - \beta 7$) y son los que albergan la capacidad catalítica del complejo gracias a la actividad de las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ en mamíferos. Por su parte, las partículas 19S son las responsables de interaccionar con las proteínas a degradar, desnaturalizarlas e introducirlas correctamente en el interior del núcleo catalítico.

La actividad proteolítica del proteasoma genera una gran variedad de fragmentos peptídicos de entre tres y veinte aminoácidos [23], si bien otras proteasas citosólicas también pueden generar péptidos de diferentes tamaños. Algunos de estos péptidos pueden acceder al lumen del retículo endoplasmático (RE) a través de una proteína denominada TAP (transportador asociado al procesamiento de antígeno) insertada en la membrana de este orgánulo [24]. TAP es un transportador heterodimérico de la familia ABC (*ATP Binding Cassete*) que forma un canal que permite el paso de péptidos de entre ocho y dieciséis aminoácidos hacia el lumen del RE [25-27]. Además, la presencia de algunos aminoácidos en ciertas posiciones, especialmente en los residuos adyacentes al extremo N-terminal y en el residuo C-terminal, puede favorecer o perjudicar el transporte de los péptidos al RE [28,29]. La importancia de TAP en el procesamiento antigénico se refleja en que esta proteína aparece alterada en distintos tumores y en que diferentes virus han desarrollado mecanismos cuyo fin es interferir en el correcto transporte de péptidos antigénicos [30,31]. Esto es debido a que las alteraciones de TAP impiden el suministro normal de péptidos al RE, de modo que éstos no pueden unirse a las moléculas del MHC y se dificulta gravemente la presentación efectiva de antígenos a las células T CD8⁺.

Una vez que alcanzan el lumen del RE, los péptidos pueden interaccionar con las moléculas del MHC de clase I, gracias a la formación de una estructura supramolecular denominada PLC (complejo de carga del péptido por sus siglas en inglés), que funciona como un mecanismo de control de calidad para la carga del péptido [32]. En primer lugar, las cadenas pesadas de las moléculas del MHC de clase I recién sintetizadas se estabilizan temporalmente por la chaperona calnexina [33]. Una vez se establece la unión entre la cadena pesada y la $\beta 2m$, la calnexina se separa de la molécula del MHC de clase I y ésta interacciona con TAP y las chaperonas tapasina, calreticulina y ERp57 para formar el PLC [34]. La calreticulina y ERp57 estabilizan la molécula del MHC de clase I vacía hasta que se une eficientemente al ligando peptídico [35,36]. ERp57 además es una tiol oxidoreductasa que colabora en la formación de enlaces disulfuro durante el ensamblaje del complejo péptido-MHC [37], tarea en la que posiblemente también esté implicada la PDI [38]. La tapasina, por su parte, es una glicoproteína que sirve de enlace entre TAP y la molécula del MHC de clase I y que también colabora en la estabilización de complejos de moléculas del MHC de clase I con péptidos de alta afinidad [39,40]. Por tanto, la tapasina participa en la edición del repertorio peptídico presentado por las moléculas del MHC de clase I [41], tarea en la que recientemente también se ha involucrado a la proteína relacionada con la tapasina o TAPBPR [42,43].

La mayoría de los péptidos son directamente generados en el citosol por el proteasoma, si bien algunos de ellos son recortados por otras peptidasas antes de acceder al RE [44,45]. Si los péptidos poseen la longitud y motivos de anclaje adecuados podrán unirse directamente a las moléculas del MHC de clase I. No obstante, es habitual que los péptidos en el RE sean recortados en el extremo N-terminal por las aminopeptidasas residentes del RE ERAP1 (ERAAP en ratones) y ERAP2. Estas enzimas, y en menor medida otras proteasas del RE y del resto de la vía exocítica, recortan los péptidos extendidos en amino para generar fragmentos de menor tamaño que pueden unirse a la molécula del MHC de clase I [46-48], por lo que también colaboran en la edición del peptidoma [49,50]. Cuando el péptido se acomoda correctamente en el sitio de unión al antígeno, el complejo trimolecular formado por el ligando peptídico en conjunto con la cadena pesada y la β_2m de la molécula del MHC de clase I abandona el PLC y se transporta por la vía exocítica hacia la superficie celular para la presentación a las células T CD8⁺ [51,52] (Figura 2).

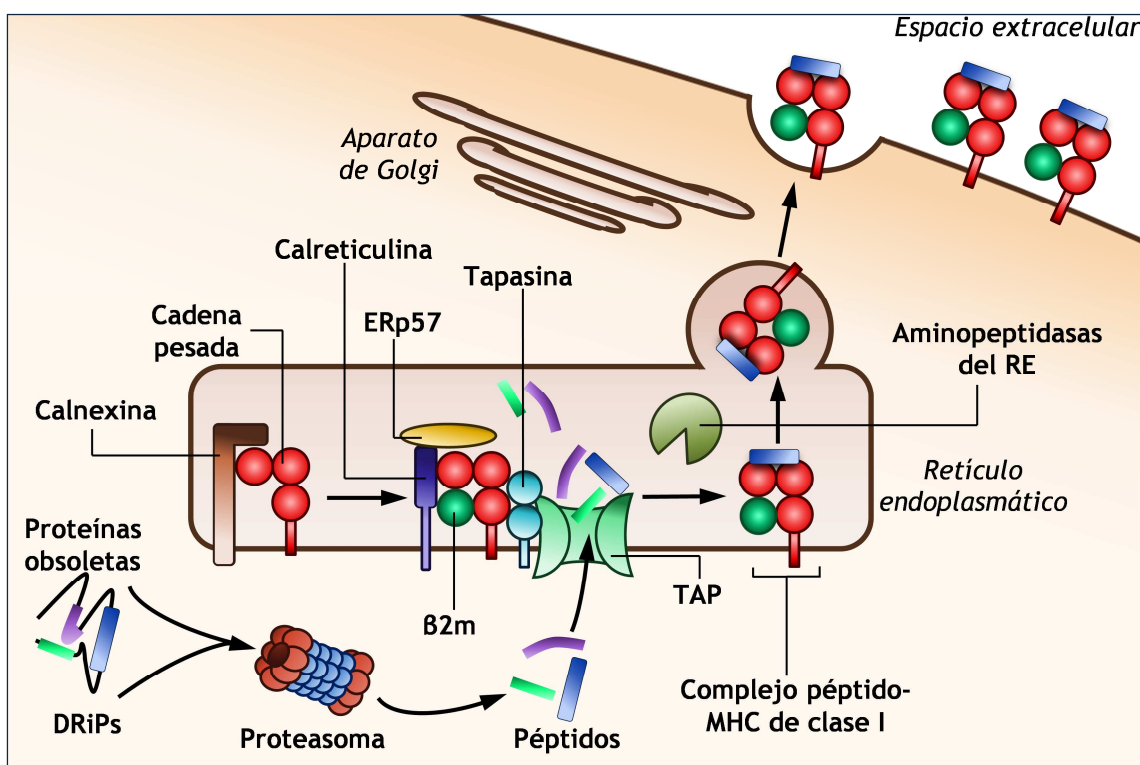


Figura 2. Vía clásica de procesamiento antigénico para moléculas del MHC de clase I. Los péptidos generados en el citosol se transportan a través de TAP al RE. Allí, el PLC permite la acomodación de los péptidos en el surco de unión al antígeno de la cadena pesada de la molécula del MHC. El complejo trimolecular formado por el péptido, la cadena pesada y la β_2m finalmente abandonan el RE para ser presentados en la superficie celular.

1.5 Presentación de antígenos por moléculas del MHC de clase I a los CTLs.

En células normales las moléculas del MHC de clase I se encuentran constantemente presentando péptidos celulares endógenos ante los cuales las células

T CD8⁺ no reaccionan debido a mecanismos de tolerancia tanto central como periférica [53]. No obstante, el reconocimiento de péptidos “no propios”, procedentes de patógenos o proteínas endógenas mutadas, en la superficie de las células presentadoras de antígeno produce la activación de las células T CD8⁺ indiferenciadas, que pasan a ser células T CD8⁺ efectoras o citotóxicas (CTLs). La activación de los clones de células T CD8⁺ que han reconocido específicamente el antígeno presentado por la molécula del MHC de clase I implica la expansión clonal de las células, de modo que el repertorio de células T se enriquece en células específicas del antígeno “no propio”. Además, la activación capacita a las células T CD8⁺ para reconocer y destruir células que expresen el antígeno específico; de esta forma, las células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares pueden ser eliminadas selectivamente [54,55]. Una vez la infección o desarrollo tumoral se ha superado, los clones de las células T CD8⁺ activadas entran masivamente en apoptosis con el objetivo de evitar lesiones en los tejidos. No obstante, un pequeño subconjunto de estas células específicas sobrevive, las cuales se transforman en células de memoria que se mantienen en bajo número en previsión de futuras exposiciones al mismo antígeno [56,57].

Las células T CD8⁺ identifican las células diana mediante el reconocimiento específico por parte del TCR del complejo trimolecular formado por el péptido junto a la molécula del MHC de clase I. El heterodímero CD8 $\alpha\beta$ también participa estabilizando el conjunto TCR-péptido-MHC de clase I [58]. Sin embargo, para que el reconocimiento conduzca a la activación de la célula T se precisan señales adicionales suministradas por otras moléculas integrales de membrana, llamadas moléculas coestimuladoras [59,60]. Además, en la activación de las células T CD8⁺ también contribuyen sustancialmente las citoquinas, de las cuales las más relevantes son la IL-12 [61] y la IL-2, que funciona como un importante factor de crecimiento para las células T [62].

Uno de los efectos más importantes que tiene lugar en las células T CD8⁺ como consecuencia del reconocimiento específico del complejo péptido-MHC de clase I es la liberación de varias citoquinas, entre las cuales cabe destacar el interferón gamma (IFN γ). Esta citoquina, perteneciente a la familia del interferón de tipo II, estimula la presentación antigénica por las moléculas del MHC de clase I y clase II [63,64] y es crucial en la inmunidad frente a virus y bacterias intracelulares y contra tumores [65]. Además, la cascada de señalización intracelular desencadenada por el contacto de la célula T CD8⁺ con la célula diana provoca la liberación de orgánulos especializados denominados gránulos citotóxicos, que contienen varias moléculas cuya finalidad es la lisis y destrucción de la célula blanco. Entre estas moléculas caben destacar las granzimas, que son enzimas de la familia de las serina proteasas que producen la apoptosis de la célula diana al activar la vía de las caspasas [66], y la perforina, una proteína cuya función es abrir poros en las membranas de la célula blanco que permiten la entrada de otras moléculas, como las granzimas, a la vez que alteran el equilibrio osmótico [67]. Otro mecanismo importante del que disponen las células T CD8⁺ para la inducción de la muerte celular programada es el que desencadena la unión de la molécula de membrana Fas, expresada en las células diana, con su ligando FasL en la superficie celular de los CTLs [68].

2 HLA-B*27: POLIMORFISMO Y ASOCIACIÓN CON LAS ESPONDILOARTROPATÍAS

2.1 Polimorfismo en HLA-B*27

La familia de moléculas HLA-B*27 es una de las más estudiadas debido a su fuerte asociación a un grupo de enfermedades autoinmunitarias denominadas espondiloartropatías (SpA) [69,70]. Atendiendo a la base de datos IPD-IMGT/HLA, en la actualidad el grupo alélico HLA-B*27 se compone de más de 150 subtipos diferentes que se designan desde HLA-B*27:01 hasta HLA-B*27:156 [10]. HLA-B*27:05 se considera el subtipo ancestral del cual han divergido el resto de alelos de la familia de HLA-B*27 [71], proteínas que difieren entre sí en una o varias sustituciones en la secuencia de aminoácidos que componen la cadena pesada de la molécula. Estos cambios afectan a las diferentes subcavidades del sitio de unión al péptido y, por ende, seleccionan el conjunto de péptidos que pueden unirse a cada uno de los subtipos (Figura 3).

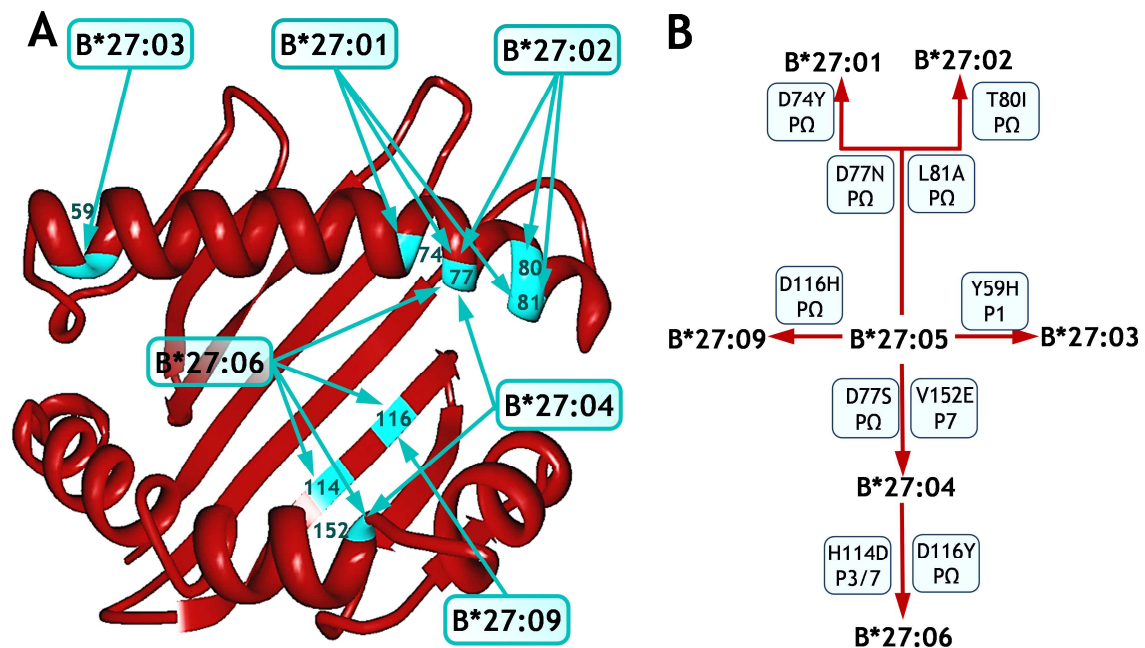


Figura 3. Polimorfismo en la familia HLA-B*27. Panel A. Sitio de unión al péptido de la molécula HLA-B*27:05 en el que se indica la posición de los residuos en los que difiere respecto a otros subtipos representativos de la familia HLA-B*27. Asimismo, se señalan con flechas los residuos alterados respecto a HLA-B*27:05 para seis subtipos de HLA-B*27 diferentes (HLA-B*27:01, -B*27:02, -B*27:03, -B*27:04, -B*27:06 y -B*27:09), representados dentro de recuadros. **Panel B.** Esquema del polimorfismo de los seis subtipos representativos de HLA-B*27. Los cambios entre los subtipos se denotan en los recuadros azules mediante el código de aminoácidos de una letra y la posición de la sustitución dentro de la cadena pesada. Además, para cada cambio se indica el residuo del ligando peptídico (P1 - P7) que se ve afectado en función de la subcavidad donde se sitúa la sustitución.

En comparación con otras moléculas HLA de clase I, HLA-B*27 es capaz de acomodar péptidos de tamaños más variados, con una notable abundancia relativa de péptidos de longitud superior a 10 aminoácidos [72]. Por ello, las diferentes posiciones de los residuos en las cadenas peptídicas que se unen a HLA-B*27 se indican desde P1 (posición 1) para el aminoácido en el extremo N-terminal hasta PΩ, que corresponde al aminoácido situado en el extremo carboxilo. El motivo de anclaje principal de la familia HLA-B*27 consiste en Arg en P2, con la excepción de alrededor de un 3% de los ligandos que poseen Gln en dicha posición [73]. Si bien los aminoácidos en otras posiciones del péptido no interaccionan tan estrechamente con la molécula de clase I dado que quedan orientados hacia la zona de contacto con el TCR, existen residuos denominados motivos de anclaje secundarios o auxiliares que también son fundamentales para la unión eficiente de los ligandos peptídicos a la molécula HLA ya que interaccionan con los aminoácidos del sitio de unión al antígeno. La preferencia de residuos en estas posiciones es más ambigua y depende de la composición y conformación del sitio de unión al antígeno y, por tanto, está muy influida por el polimorfismo en la molécula HLA que afecta a los residuos de la cadena pesada [74]. De esta forma, los motivos de anclaje auxiliares más restrictivos son, en orden decreciente, PΩ, P1 y P3. Así, en el caso de la molécula prototípica HLA-B*27:05, los aminoácidos Leu, aromáticos como Phe y Tyr o básicos como Arg y Lys son habituales en los residuos en PΩ, en P1 abundan Gly, Arg y Lys, y los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr son comunes en P3 [72,75].

En el caso de HLA-B*27, las diferencias en la preferencia por residuos en los motivos de anclaje es la razón por la que los repertorios de péptidos presentados por los diferentes subtipos sólo coincidan parcialmente: si bien existen ligandos que se pueden unir a varios subtipos de HLA-B*27 diferentes, muchos son específicos de sólo uno o pocos subtipos [75]. Por tanto, tanto las preferencias de residuos en los diferentes subtipos de HLA-B*27 como la existencia de motivos de anclaje comunes para la unión efectiva a todos o la mayoría de los subtipos siguen siendo desconocidas.

2.2 Distribución geográfica del polimorfismo de HLA-B*27

La distribución de los diferentes alelos de la familia HLA-B*27 es muy desigual entre las poblaciones mundiales. Mientras que HLA-B*27:05, el subtipo arquetípico del que se supone que derivan todos los demás, se encuentra repartido mundialmente, el resto de subtipos se concentran mayoritariamente en ciertas regiones geográficas (Figura 4). De este modo, el alelo HLA-B*27:03 se encuentra ampliamente representado en poblaciones del oeste de África y afroamericanas mientras que HLA-B*27:04 se localiza principalmente en poblaciones del sureste asiático. HLA-B*27:06, un alelo que se supone que proviene evolutivamente de HLA-B*27:04, se encuentra frecuentemente en el archipiélago indonesio. Estos dos alelos muestran una prevalencia que supera incluso a la de la molécula B*27:05 en las zonas donde son comunes. Los alelos HLA-B*27:02 y -B*27:09 son frecuentes en regiones en torno al mar Mediterráneo, donde la molécula HLA-B*27:02 a menudo se encuentra

igual o superiormente representada que HLA-B*27:05 en muchas de estas poblaciones [76].

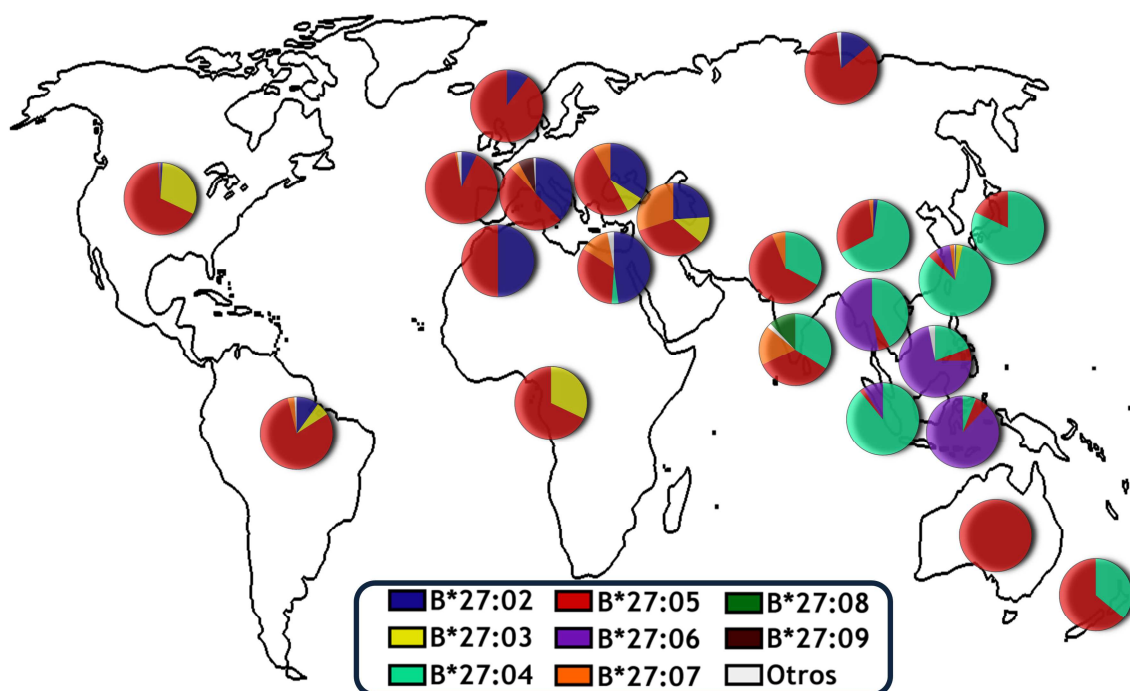


Figura 4. Distribución de los alelos de la familia HLA-B*27 en diferentes poblaciones del mundo. Las diferentes poblaciones actuales se muestran con un círculo y la proporción de los alelos de HLA-B*27, indicados en la leyenda inferior, se representa en función del área de los sectores. Los datos se extrajeron de [76].

2.3 Espondiloartropatías

La familia HLA-B*27 está considerablemente asociada a las espondiloartropatías seronegativas (SpA), trastornos reumáticos negativos para el factor reumatoide que se caracterizan por la inflamación en las articulaciones, especialmente en la columna vertebral [77,78]. Este conjunto de enfermedades incluye la espondilitis anquilosante (AS), la forma más común y prototípica de SpA y la más fuertemente asociada a HLA-B*27: en torno a un 90% de los pacientes portan moléculas de esta familia [79]. No obstante, dentro del grupo de moléculas HLA-B*27 los subtipos HLA-B*27:06 y -B*27:09 son la excepción en tanto que su asociación con la AS es muy débil o nula, por lo que se consideran alelos protectores contra la enfermedad [80]. Al contrario que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, la AS es más común y severa en varones que en mujeres, y los síntomas se manifiestan habitualmente a comienzos de la edad adulta [81].

Otra tipo de SpA relevante es la enfermedad de Reiter o artritis reactiva (ReA), que se encuentra asociada a HLA-B*27 en torno al 50% de los casos [82]. Su nombre hace referencia a que los primeros síntomas aparecen como “reacción” frente a infecciones gastrointestinales o urogenitales provocadas por bacterias Gram

negativas que consecuentemente se denominan bacterias artritogénicas. Algunos géneros que incluyen bacterias artritogénicas son los de los parásitos intestinales *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Campylobacter*, o sexuales como *Chlamydia* [83].

Se han propuesto tres hipótesis para explicar la patogénesis de las distintas SpAs, todas basadas en el alto nivel de relación de estos trastornos con la molécula HLA-B*27 y la participación de distintos elementos de la respuesta inmunológica [84] (Figura 5). La primera de ellas es la hipótesis de respuesta a proteína desplegada (en inglés *unfolded protein response* o UPR), que postula que la tasa reducida de plegamiento que muestran las moléculas HLA-B*27 provoca la acumulación de éstas en el RE, generando un estrés que resulta finalmente en la producción de citoquinas como IL-23 que activan las células T_H17 , de carácter proinflamatorio [85]. La siguiente es la hipótesis de las cadenas pesadas libres, que se basa en la capacidad de las moléculas HLA-B*27 para formar homodímeros de cadenas pesadas, disociados de la β_2m y de ligandos peptídicos, que son reconocidos en la superficie celular por receptores específicos de alelo HLA que poseen ciertas células proinflamatorias del sistema inmunológico como las células NK y las células T [86]. Por último, la hipótesis del péptido artritogénico sostiene que la respuesta autoinmunitaria en los pacientes sería debida al mimetismo molecular entre epítopos bacterianos y péptidos propios restringidos por HLA-B*27. En esta hipótesis, tras una respuesta inmunológica convencional basada en interacciones de alta afinidad con el complejo formado por un péptido bacteriano con la molécula HLA, algunas células T podrían establecer interacciones de baja afinidad con otros complejos de HLA que presentaran algún ligando endógeno con la suficiente homología con el péptido bacteriano. Esto desencadenaría una respuesta autorreactiva que iniciaría el daño autoinmunitario, pues las células T reaccionarían inapropiadamente frente a células que presenten los péptidos propios, provocando a la larga los signos clínicos que definen a las diversas SpAs como la ReA [87].

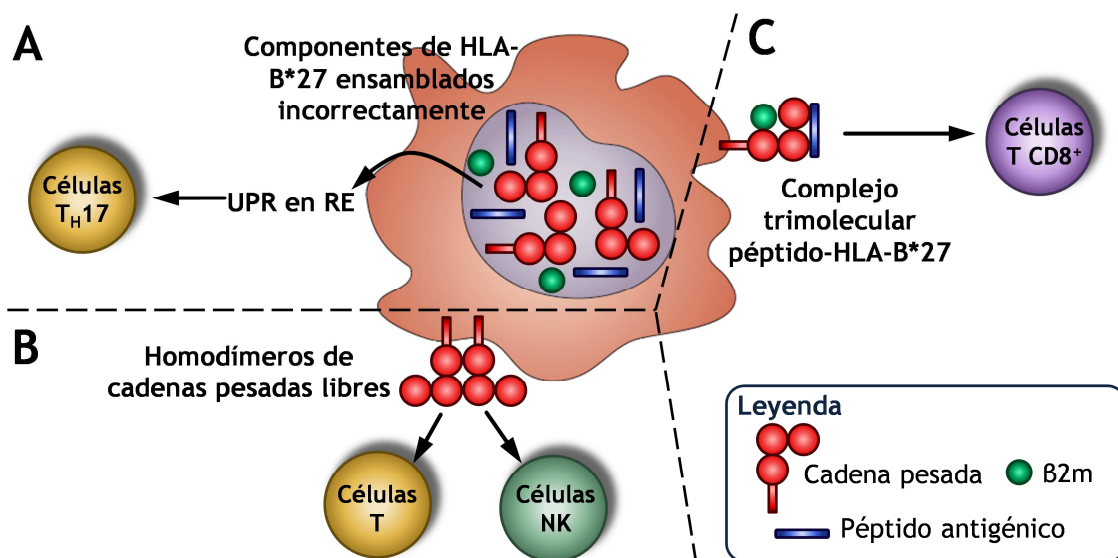


Figura 5. Modelos de patogénesis propuestos para las espondiloartropatías. Se representan las tres hipótesis clásicas que explican la patogénesis de la SpA en diferentes paneles separados por líneas discontinuas. **Panel A:** Hipótesis de la respuesta a proteína desplegada **Panel B:** Hipótesis de las cadenas pesadas libres. **Panel C:** Hipótesis del péptido artritogénico. Figura basada en [84].

3 PATÓGENOS

3.1 *Chlamydia trachomatis*

La bacteria artritogénica *Chlamydia trachomatis* es un parásito intracelular obligado que se transmite por vía sexual infectando el epitelio urogenital. Aunque inicialmente provoca una reacción inflamatoria local, la infección por *C. trachomatis* es difícil de identificar y suele permanecer subclínica y sin diagnosticar en una alta proporción de individuos [88,89].

3.1.1 *Ciclo de desarrollo*

C. trachomatis muestra un ciclo de desarrollo bifásico que alterna formas extracelulares infecciosas con escaso metabolismo –cuerpos elementales (EB por sus siglas en inglés)– con formas intracelulares no infecciosas, los cuerpos reticulares (RB por sus siglas en inglés) [90]. El ciclo comienza cuando las células epiteliales de la mucosa captan los EBs, que se rodean por membranas endosómicas para dar lugar a vacuolas intracelulares denominadas inclusiones [91]. Las inclusiones conforman un ambiente protegido del entorno citosólico en el que el parásito puede activarse metabólicamente dando lugar a los RBs, que comienzan a replicarse mediante fisión binaria dentro de la vacuola. Finalmente, los RBs se transforman de nuevo en EBs infectivos, que son liberados por exocitosis al exterior celular para infectar futuras células, cerrando así el ciclo de desarrollo de la bacteria (Figura 6).

No obstante, bajo ciertas condiciones de estrés los RBs pueden convertirse en formas persistentes aberrantemente largas, que son incapaces de dividirse. Estas formas se mantienen hasta que desaparecen las circunstancias adversas como las que suponen la exposición a citoquinas del hospedador –especialmente las secretadas por células T_H1 – o antibióticos que afectan a la síntesis de la pared celular, o en condiciones de privación de recursos, fundamentalmente cuando se produce escasez de triptófano como consecuencia de la acción de la enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) activada por el IFN γ [92] (Figura 6). Aun así, se ha observado que las formas persistentes son capaces de replicar el cromosoma bacteriano y de expresar proteínas involucradas en la replicación del DNA [93,94]. Las formas persistentes permanecen en los tejidos del hospedador, provocando una infección crónica pero silente que podría ser crítica para el desarrollo y evolución de la ReA.

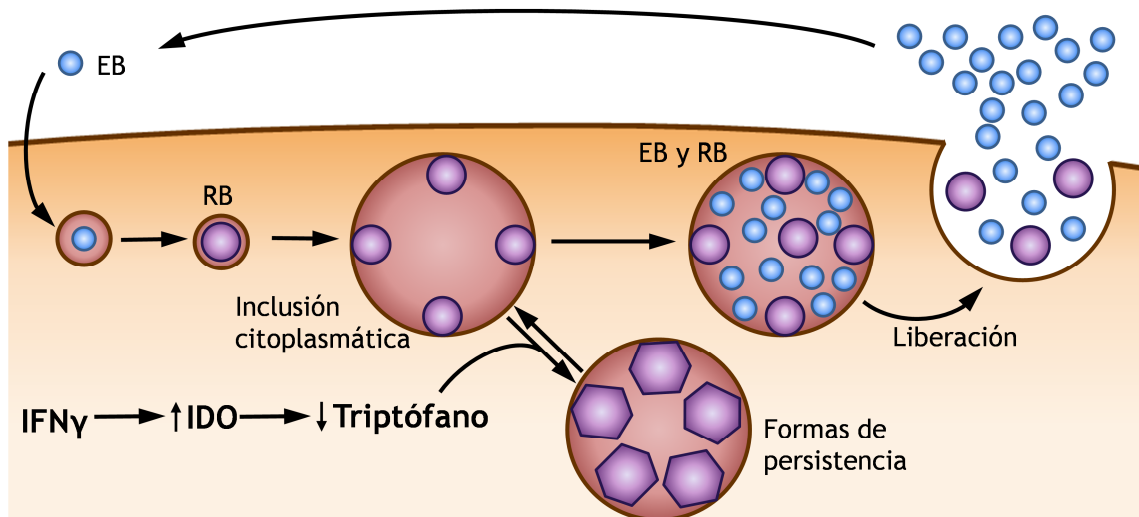


Figura 6. Ciclo de desarrollo biológico de *Chlamydia trachomatis*. El parásito intracelular *C. trachomatis* posee un ciclo de desarrollo en el que se distinguen dos fases, la de cuerpos elementales (EBs) y la de cuerpos reticulares (RBs). En condiciones de estrés para la bacteria, como las que supone la privación de triptófano, aparecen formas de persistencia que se mantienen hasta que desaparecen las circunstancias adversas. Imagen basada en [92].

3.1.2 *C. trachomatis* y espondiloartropatías

C. trachomatis se ha propuesto como una de las principales bacterias artritogénicas, es decir, bacterias cuyas infecciones se encuentran relacionadas con el desarrollo de la ReA y otras SpAs. Este patógeno ya se había involucrado previamente en otros trastornos de carácter autoinmunitario como es la enfermedad cardíaca en ratones, cuya causa es el mimetismo antigénico entre autoantígenos y péptidos derivados de esta bacteria [95]. En el caso de las SpAs, existen varias evidencias que recalcan el papel de esta bacteria en la enfermedad. En ratas transgénicas para HLA-B*27:05 se ha observado que la exposición a *Chlamydia trachomatis* provoca una ruptura de la tolerancia en células T CD8⁺ restringidas por HLA-B*27:05, capacitando a éstas para lisar dianas HLA-B*27⁺ [96]. La respuesta inmunológica en individuos infectados con *C. trachomatis* implica la participación de células T CD8⁺ [97], si bien su papel en la eliminación del patógeno no es completamente imprescindible [98]. Además, *C. trachomatis* se detecta habitualmente en muestras de líquido sinovial de pacientes con ReA [99], donde en ocasiones se observan formas de persistencia que probablemente expresan proteínas implicadas en la replicación del DNA como es el caso de la primasa de DNA [93,94]. Estos datos sugieren que probablemente un ligando derivado de estas proteínas de persistencia podría ser un péptido artritogénico que mostrase alta homología con un péptido artritogénico endógeno y fuese capaz de iniciar el daño autorreactivo.

3.2 Virus respiratorio sincitial humano

El virus respiratorio sincitial humano (HRSV por sus siglas en inglés) es un virus del género *Pneumovirus* que provoca infecciones del tracto respiratorio superior en seres humanos. HRSV forma parte de la familia *Paramyxoviridae* que se enmarca, junto a *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y *Bornaviridae*, dentro del orden de los Mononegavirales, denominación que hace referencia a que todos sus miembros portan un genoma constituido por una única hebra de RNA de polaridad negativa [100]. Es por ello que HRSV, como todos los Mononegavirales, forman parte del grupo V según la clasificación de Baltimore [101].

3.2.1 Estructura de HRSV

HRSV es un virus envuelto [102] en cuya bicapa lipídica se encuentran integradas tres proteínas: la proteína pequeña hidrofóbica (SH), la glicoproteína (G) y la proteína de fusión (F) (Figura 7). Bajo la envuelta se encuentra una malla formada por numerosas repeticiones de la proteína de la matriz (M). En el núcleo del virión se halla el RNA viral asociado a cuatro proteínas diferentes: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2-1) y la polimerasa (L), encargada de la replicación y transcripción del genoma (Figura 7). Además, el genoma de HRSV da lugar a las proteínas no estructurales 1 y 2 (NS1 y NS2), que como su nombre indica no forman parte del virión sino que su función es de interferencia en la respuesta inmunológica del hospedador. Por último, el genoma de HRSV también codifica para otra proteína no estructural, M2-2, con funciones en el cambio entre transcripción y replicación.

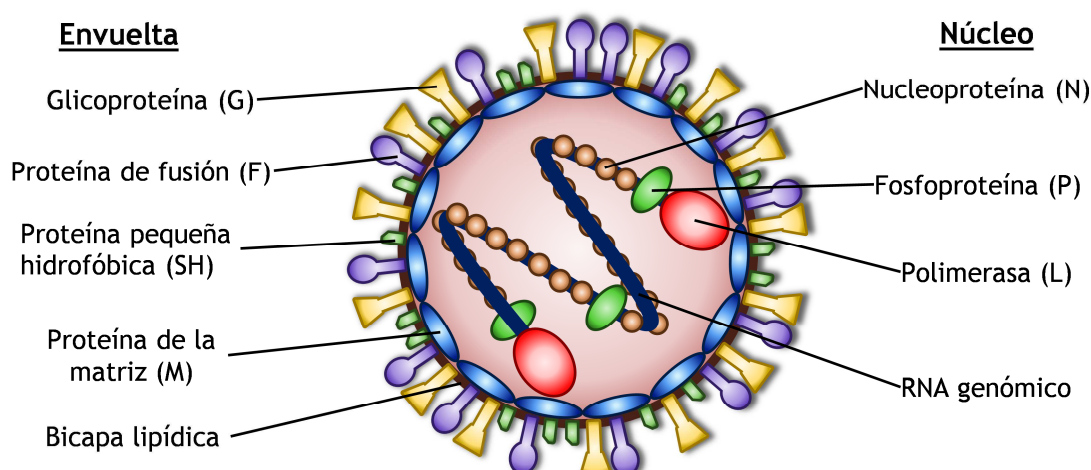


Figura 7. Estructura de HRSV. Representación esquemática del virión de HRSV. En la parte izquierda se indican los componentes relacionados con la envuelta viral y en la parte derecha se señalan los elementos del núcleo del virión.

3.2.2 Genoma, replicación y transcripción viral

HRSV presenta un genoma formado por más de 15 kilobases de RNA monocatenario de sentido negativo, dividido en diez genes que codifican para las once proteínas anteriormente mencionadas, puesto que el gen M2 presenta dos ORFs (marcos abiertos de lectura, por sus siglas en inglés) que codifican para las proteínas M2-1 y M2-2, respectivamente. Además, en el extremo 3' del genoma existe una pequeña región, el promotor 3', que permite la incorporación de la polimerasa viral para llevar a cabo la replicación y la transcripción. Todos los genes se transcriben individualmente generando 10 moléculas de RNA mensajero (mRNA) distintas. Cada gen va precedido por una secuencia muy conservada de nueve nucleótidos que marca el inicio de la transcripción (señal GS, del inglés *Gene Start*), y termina con secuencias de doce o trece nucleótidos que marcan el final de la transcripción (señal GE, del inglés *Gene End*). Además, los genes de HRSV se disponen en el orden 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5', que tiene importantes implicaciones en la regulación de la expresión génica, como se describirá más adelante. Los nueve primeros genes se separan por regiones intergénicas de distinto tamaño, mientras que los genes M2 y L se solapan de modo que la señal GS del gen de la polimerasa está por encima de la señal GE del gen M2 (Figura 8).

Tanto la replicación como la transcripción viral son resultado de la actividad de la polimerasa viral, que es una RNA polimerasa dependiente de RNA. La replicación se produce cuando la polimerasa comienza a sintetizar la molécula complementaria de RNA desde el promotor 3' pero ignora las señales GS y GE de los genes virales, de modo que genera una hebra completa de RNA de polaridad positiva complementaria al genoma —el antígenoma— que sirve como molde para la fabricación de numerosas copias del genoma de HRSV [103].

Por otro lado, la transcripción de HRSV es un proceso secuencial, en el que la polimerasa viral sintetiza uno a uno los mRNAs para cada gen comenzando por el promotor del extremo 3' del genoma. A medida que avanza a lo largo de la hebra de RNA genómico, la polimerasa inicia la síntesis de mRNA en las señales GS de cada gen y la detiene en las GE, evitando la transcripción de las regiones intergénicas. Este mecanismo secuencial de parada-comienzo (*start-stop*) de la transcripción es relativamente inestable, de tal forma que conforme la RNA polimerasa recorre el genoma viral aumentan las probabilidades de que se ésta se desvincule de la hebra que está procesando, especialmente en las regiones intergénicas [104]. Cuando esto ocurre, la polimerasa debe reiniciar la transcripción desde el promotor 3' de nuevo. Como consecuencia, los genes se transcriben con mayor frecuencia conforme más cercanos se encuentran al extremo 3' [105,106]. Así, se genera un gradiente transcripcional en los mRNAs de los diferentes genes que, al traducirse, implican cantidades decrecientes de proteína (Figura 8). Este es el principal mecanismo de regulación génica que utiliza HRSV —y la mayoría de los Mononegavirales— para ajustar la abundancia relativa de proteínas [107].

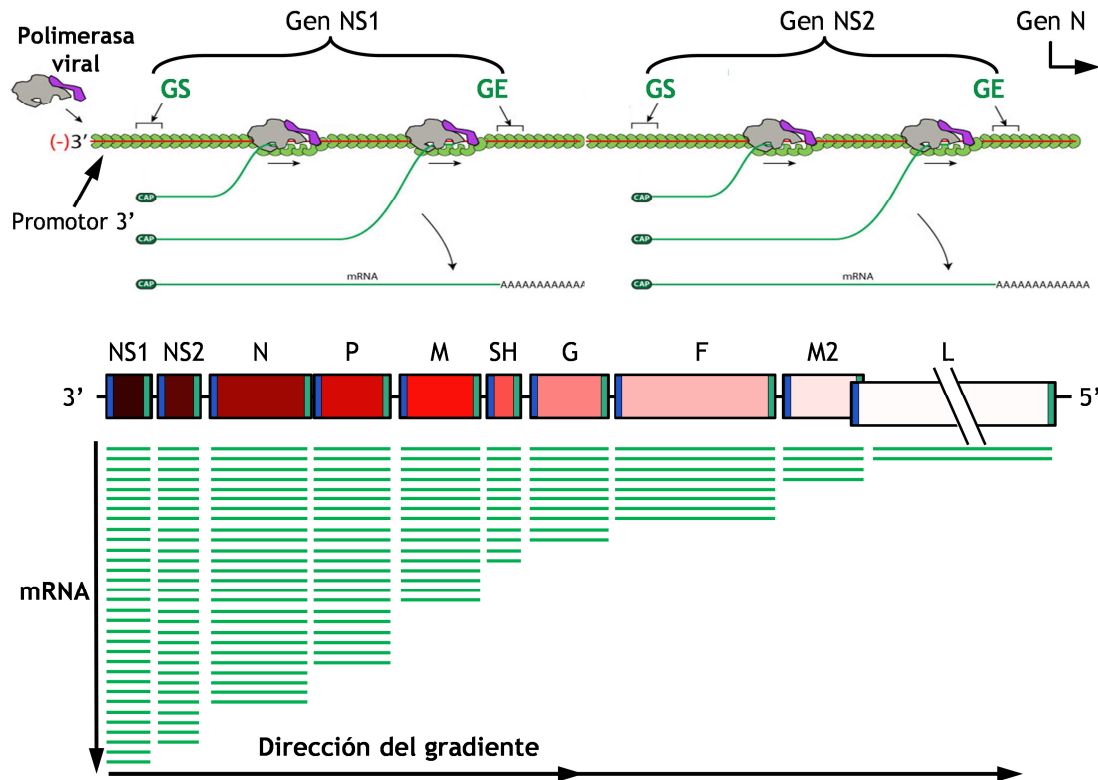


Figura 8. Transcripción del genoma de HRSV. Panel A. Se representa el proceso de transcripción, en el que la polimerasa viral comienza la síntesis de RNA complementario a partir del único promotor 3' del genoma. A medida que la polimerasa avanza en sentido 3'→5', la transcripción en mRNA comienza en las señales de inicio (GS) de cada gen y se termina en las señales de parada (GE). Panel B. En la parte superior se indica la disposición de los genes de HRSV a lo largo del genoma viral desde la región 3', donde se encuentra el promotor, hasta la región 5'. Asimismo, se indican las señales de inicio (GE) y final (GS) de la transcripción para cada gen en azul y verde, respectivamente. En aras de la simplicidad el gen de la polimerasa (L) se representa acortado. En la parte inferior se muestra el sentido del gradiente en la transcripción de los genes virales que determina cantidades decrecientes de mRNA a medida que los genes se sitúan más alejados del extremo 3'. Las abreviaturas utilizadas para los genes virales son NS1 (proteína no estructural 1), NS2 (proteína no estructural 2), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de la matriz), SH (proteína pequeña hidrofóbica), G (glicoproteína), F (proteína de fusión), M2 (proteína de la matriz 2) y L (polimerasa).

3.2.3 Patología e inmunología de HRSV

HRSV es un virus muy común que genera infecciones moderadas en adultos sanos. Sin embargo, es la causa más importante de enfermedades del tracto respiratorio inferior, como neumonía y bronquiolitis, en recién nacidos y niños pequeños [108,109]. Además, HRSV representa un riesgo severo para la salud en ancianos [110,111] e individuos inmunocomprometidos (receptores de trasplantes, pacientes de oncología y enfermos de sida) [112,113]. Asimismo, se trata de un virus que ocasiona reinfecciones frecuentes [114] y supone un importante problema sanitario tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo [115]. Tanto es así que se estima que hasta un cuarto de millón de muertes anuales se deben a infecciones por este virus [115,116], la mayoría en países en vías de desarrollo. Pese a todo esto, actualmente no existe ninguna vacuna ni tratamiento antiviral efectivo contra HRSV, y los tratamientos profilácticos con anticuerpos

monoclonales, extremadamente costosos e inaccesibles en países en vías de desarrollo, sólo se administran en niños con alto riesgo de contraer la forma severa de la enfermedad provocada por HRSV [117]. Por ello, de acuerdo con las agencias sanitarias internacionales, el diseño de vacunas que generen inmunidad duradera frente al virus es una necesidad de primer orden a escala mundial.

El primer intento de vacunación se llevó a cabo en los años 60 en niños a los que se inoculó una preparación del virus inactivado con formalina. Desgraciadamente, el ensayo fue un fracaso rotundo puesto que la inmunización con el virus no sólo no generó inmunidad protectora sino que los niños vacunados manifestaron paradójicamente un empeoramiento de la enfermedad al sufrir reinfecciones por HRSV, conduciendo incluso a la muerte de algunos de ellos [118]. Estos resultados catastróficos han dificultado durante décadas la investigación de nuevas formulaciones vacunales frente a HRSV. No obstante, en los últimos años la investigación de vacunas ha experimentado un cambio de paradigma, desde un desarrollo empírico por ensayo-error hacia un diseño más racional basado en las características biológicas y funcionales del patógeno y de la respuesta inmunológica frente a él [119]. Esto ha permitido que varios candidatos de vacuna frente a HRSV se encuentren actualmente en fase clínica ([120] y sitio web de PATH [121]).

La inmunología de la infección por HRSV se ha estudiado durante décadas y, aunque sigue siendo un campo intenso de investigación, en la actualidad se han definido numerosos elementos del sistema inmunológico, tanto innato como adquirido, que intervienen en la respuesta frente a HRSV [122]. Este virus es capaz de inducir respuestas inmunológicas humorales y celulares tanto a nivel sistémico como de mucosas. Por un lado, la respuesta de anticuerpos es imprescindible ya que HRSV estimula la producción específica de IgA nasal e IgG sérica que correlacionan con la eliminación del virus. Sin embargo, los niveles de estos anticuerpos neutralizantes tienden a reducirse tras la infección, por lo que no se genera una inmunidad protectora y los individuos vuelven a sufrir reinfecciones [123,124]. Por otra parte, las respuestas mediadas por células T también parecen ser relevantes ya que los niños con alteraciones en dichas respuestas inmunológicas muestran títulos virales superiores y una mayor severidad de la enfermedad [125,126]. Además, al evaluar los subconjuntos de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en modelos murinos, se ha observado que tanto la respuesta citotóxica mediada por el MHC de clase I como la respuesta colaboradora mediada por el MHC de clase II son fundamentales en la eliminación de las infecciones por HRSV [127]. Por un lado, el fenotipo de las células T $CD4^+$ determina en gran medida el éxito de la respuesta inmunológica frente al virus puesto que el desequilibrio por T_H2 en detrimento de T_H1 se ha relacionado con un empeoramiento de la enfermedad [128]. Por otra parte, las células T citotóxicas $CD8^+$ también se han asociado a la inmunopatología de la enfermedad en ratones [127], aunque su grado de contribución en humanos aún está sujeto a debate [129]. En todo caso, debido a su capacidad de identificación y eliminación de células infectadas por virus, se considera que los CTLs son fundamentales para garantizar la eliminación total de HRSV [130].

Diversos estudios han analizado la respuesta inmunológica celular mediada por moléculas HLA de clase I mediante CTLs de individuos infectados con HRSV [131-135].

No obstante, todos estos trabajos se realizaron utilizando únicamente péptidos sintéticos procedentes de algunas proteínas virales y no se analizó el conjunto del proteoma viral completo. Esta aproximación presenta dos limitaciones básicas. Por un lado, puesto que el estudio se reduce a una o pocas proteínas virales, se pierde la información sobre otras proteínas no estudiadas que podrían ser relevantes en la respuesta inmunológica frente al virus. Por otra parte, mediante este tipo de estudios resulta imposible establecer perfiles de inmunodominancia en la respuesta inmunológica global, ya que no se trabaja con el virus completo.

En un trabajo posterior se logró identificar mediante espectrometría de masas sendos ligandos de HRSV asociados a las moléculas HLA-A*02:01 y -B*07:02, respectivamente, en células infectadas con este virus [136]. Sin embargo, las dos secuencias obtenidas constituían una muestra insuficiente para componer una perspectiva global de la respuesta inmunológica frente a HRSV mediada por las moléculas del MHC de clase I. Además, este trabajo dejaba abierta una cuestión muy relevante acerca de la presentación de antígenos procedentes de este virus, ya que no determinaba si un tipo de molécula HLA particular podía presentar varios ligandos de HRSV simultáneamente o bien, tal como sugería el estudio, cada tipo de molécula HLA presenta un único ligando de este virus.

3.3 Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) es el representante arquetípico del género *Hepacivirus*. Forma parte de la familia *Flaviviridae* que pertenece al grupo IV según la clasificación de Baltimore, ya que su genoma consiste en RNA monocatenario de polaridad positiva [101].

3.3.1 Estructura y ciclo biológico

HCV es un virus envuelto constituido por el RNA viral empaquetado por la proteína de la cápsida (C), que se encuentra protegido por una bicapa lipídica en la que se insertan heterodímeros de las dos proteínas de la envuelta (E1 y E2). El genoma de 9,6 kilobases está formado por una sola hebra de RNA de polaridad positiva que consta de diez genes flanqueados por dos regiones UTR (regiones no traducidas, en inglés), 5'UTR y 3'UTR. Este genoma se traduce a partir de un IRES (sitio interno de entrada del ribosoma, en inglés) situado en 5'UTR y da lugar a una única poliproteína que posteriormente se procesa por diferentes proteasas celulares y virales para dar lugar a las diversas proteínas del virus. Los primeros genes en traducirse, los más próximos a 5'UTR, son los que codifican para las proteínas estructurales anteriormente comentadas. Los siete genes restantes codifican para proteínas no estructurales con diversas funciones en la biología del virus: una viroporina p7 (NS1), una cisteína proteasa transmembrana NS2, una serina proteasa/helicasa NS3, un cofactor para la proteasa NS3 llamado NS4A, una proteína

de remodelación de la membrana NS4B, una fosfoproteína de diversas funciones NS5B y, finalmente, la RNA polimerasa dependiente de RNA NS5B [137] (Figura 9).

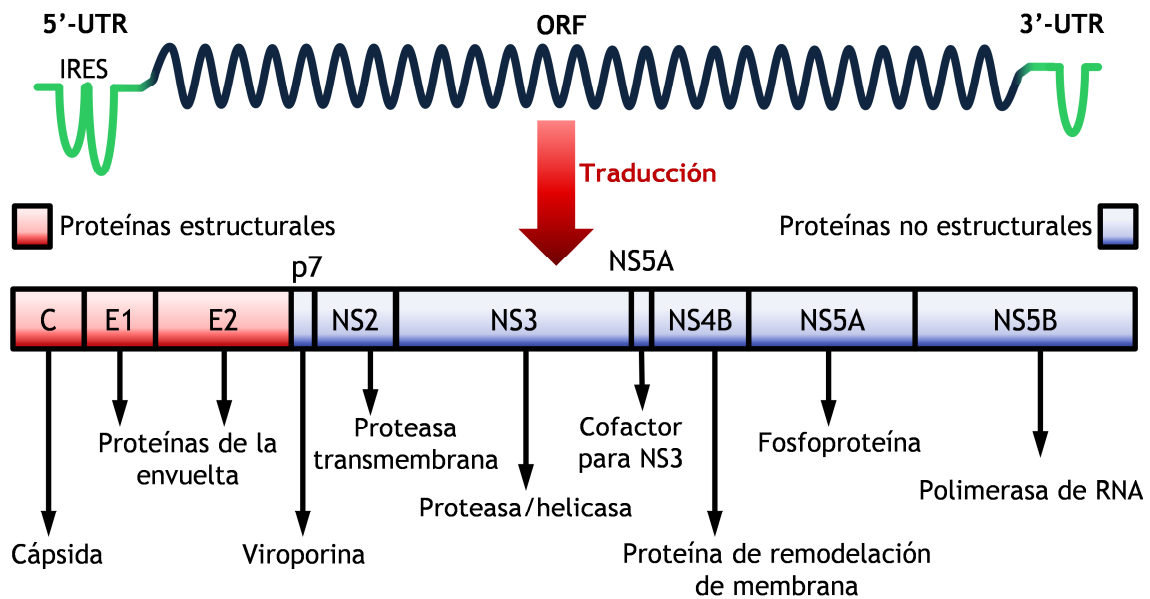


Figura 9. Genoma y proteoma de HCV. El genoma de HCV, en la parte superior, contiene un único ORF flanqueado por regiones 5'-UTR y 3'-UTR. La traducción mediada por el IRES da lugar a una poliproteína, representada en la parte inferior, que contiene dos tipos de proteínas, las estructurales (mostradas en rojo) y las no estructurales (en azul). A lo largo del ciclo infeccioso del virus la poliproteína se procesa por distintas proteasas celulares y virales para dar lugar a las diez proteínas que conforman el proteoma viral.

HCV infecta hepatocitos de forma casi exclusiva [138]. El virus accede a las células hospedadoras mediante la interacción de la proteína E2 de la envuelta con diversas proteínas de la superficie celular. Posteriormente, el genoma viral se libera por un proceso dependiente de pH al citoplasma, donde tiene lugar la traducción a la poliproteína. A continuación, la peptidasa señal y peptidasa del péptido señal celulares escinden las proteínas estructurales de la poliproteína, tras lo cual las proteasas virales NS2-NS3 y NS3-NS4A procesan el resto de la poliproteína. Posteriormente, las proteínas virales NS4B y NS5A inducen cambios en la membrana del retículo para formar una serie de vesículas que o bien permanecen ligadas al RE o bien se diseminan por el citosol formando una red membranosa que alberga los complejos de replicación viral [139]. En dicha red la RNA polimerasa NS5B lleva a cabo la replicación del genoma viral mediante la síntesis de RNA complementario de sentido negativo, que sirve como molde para el RNA genómico de polaridad positiva. Paralelamente, las proteínas de la cápsida y NS5A se asocian a gotas lipídicas (*lipid droplets*) que servirán como andamiaje en el proceso de ensamblaje del virión, el cual se completa cuando las proteínas de la cápsida y el RNA viral se organizan en la membrana citosólica del RE en un proceso mediado por p7, NS2 y NS3-NS4A [140]. Finalmente, la forma y composición del virión se modelan a medida que avanza por la vía exocítica para liberarse al espacio extracelular [141].

3.3.2 Patogénesis

La vía de entrada de HCV es principalmente percutánea, aunque también se han descrito infecciones a través de las mucosas. Fundamentalmente se transmite mediante inyecciones con jeringas contaminadas tanto en la práctica médica convencional como en el consumo de sustancias ilegales. HCV también se puede transmitir de forma menos frecuente por vía sexual o desde la madre al hijo.

Los estudios serológicos indican que HCV ha infectado a alrededor de un 2% de personas en el mundo [142,143]. La infección aguda con HCV es normalmente asintomática, si bien en una minoría de personas se presentan los síntomas típicos de hepatitis viral aguda [144]. En alrededor del 30% de los casos se produce una eliminación total del virus de manera espontánea a los seis meses. Cuando esto no sucede, los pacientes desarrollan una infección crónica cuyas manifestaciones y progresión son muy heterogéneas entre los distintos individuos: desde infecciones persistentes estables hasta la aparición sucesiva de cirrosis, fallo hepático y, en un número limitado de casos, carcinoma hepatocelular [145].

Una de las características más destacables de HCV deriva de la alta tasa de error que posee la RNA polimerasa viral ya que no dispone de mecanismo de corrección de errores [146]. Esto provoca una alta tasa de mutación durante la replicación de modo que en un único paciente se encuentra circulando simultáneamente una mezcla heterogénea de variantes virales, relacionadas genéticamente con una o más secuencias fundadoras, que se denomina colectivamente cuasiespecie. Además, se pueden distinguir al menos seis genotipos distintos, distribuidos diferencialmente entre las diversas regiones geográficas, que se dividen a su vez en varios subtipos [147]. Esta extraordinaria variabilidad genética dificulta el diagnóstico, se relaciona con la resistencia a los tratamientos antivirales cuyo mecanismo consiste en interferir en la actividad de diferentes proteínas virales [148], y explica, junto a otros mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica, la ausencia de una vacuna protectora frente a HCV [149].

3.3.3 Inmunología de la infección por HCV

En la respuesta inmunológica frente a HCV entran en juego varios elementos de la respuesta inmunológica. La inmunidad innata desempeña un papel significativo en las primeras fases de la infección, controlando la replicación viral sobre todo a través de la señalización por interferones del tipo I y del tipo III [150]. Sin embargo, para la correcta eliminación del virus es imprescindible la activación de elementos del sistema inmunológico adaptativo [151,152]. La colaboración de la respuesta humoral es importante pero no imprescindible, tal y como demuestra la eliminación del virus en pacientes con hipogammaglobulinemia [153]. No obstante, la actividad de las células T es crucial en el curso de la enfermedad y en gran medida determina la cronificación y persistencia de la infección. En su función de vigilancia, las células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HCV no sólo circulan por el torrente sanguíneo sino que

también se infiltran extensamente en el hígado, contribuyendo colateralmente a la inmunopatogénesis de la enfermedad al dañar el tejido hepático y promover la inflamación [154]. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ colaboran en el control inicial de la viremia aguda tanto en chimpancés como en humanos, y la memoria protectora de estos tipos celulares es fundamental para la protección frente a la reinfección [155-157]. Se ha observado que las células T parecen mantenerse durante más tiempo en pacientes que resuelven la infección espontáneamente [158]. La importancia de las células T en la respuesta frente a HCV queda patente por la asociación entre eliminación viral espontánea y la expresión de diferentes alelos HLA de clase I (HLA-A*03, HLA-B*27, HLA-B*57) y de clase II (HLA-DRB1*01:01) [159-161]. El papel protector de estas moléculas del MHC probablemente se debe a que son capaces de presentar epítomos particularmente inmunogénicos y/o conservados funcionalmente entre los diferentes genotipos y subtipos, tal y como ilustran los casos particulares de protección de los grupos alélicos HLA-B*57 y HLA-B*27 [162,163].

No obstante, debido a la notable capacidad antiviral de las células T, HCV ha desarrollado varias estrategias de evasión inmunológica frente a estas células [164]. Una de ellas se basa en la presencia constante de altos niveles de antígenos que producen una activación crónica de los linfocitos T. Esto provoca el denominado agotamiento de las células T, en el que los linfocitos van perdiendo secuencialmente funcionalidad como consecuencia de la expresión de niveles paulatinamente menores de IL-2, TNF α y, en las fases más extremas, IFN γ [165]. Otra estrategia de evasión de la respuesta por células T está relacionada con la alta tasa de replicación de HCV y la ausencia de corrección de errores de la polimerasa viral. Dichas características facilitan la aparición de mutaciones de escape, es decir, variantes virales que evitan el reconocimiento inmunológico por cambios discretos en la secuencia genética. Aunque estas mutaciones tienen costes potenciales en la replicación y efectividad viral (*viral fitness*), pueden ser favorables si afectan a los distintos epítomos de las células T en residuos involucrados con el procesamiento antigénico, la unión a las moléculas HLA o el reconocimiento por el TCR [166]. Dado que el papel de las células T CD4⁺ en la respuesta antiviral es más indirecto, las mutaciones de escape viral son más comunes en los epítomos reconocidos por células T CD8⁺ [167].

En el estudio de la respuesta frente a HCV de células T CD8⁺ restringidas por HLA-B*27 se han identificado varios epítomos procedentes de proteínas no estructurales, de los cuales tres procedían de la RNA polimerasa viral NS5B [168]. Dos de estos epítomos, NS5B₄₂₄₋₄₃₂ y NS5B₅₁₉₋₅₂₇, eran la diana de la respuesta inmunológica mediada por células T CD8⁺ en prácticamente todos los pacientes HLA-B*27⁺ con infección aguda o resuelta por HCV del genotipo 1 [168,169]. Un tercer epítomo, NS5B₄₀₃₋₄₁₁, generaba una potente respuesta específica mediada por IFN γ en un único paciente procedente de Sicilia pero no en el resto de los pacientes europeos.

V. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral consiste en el estudio de la presentación antigénica y respuesta inmunológica de ligandos procedentes de dos virus, HCV y HRSV, y una bacteria, *Chlamydia trachomatis*, presentados por diversas moléculas HLA de clase I. Los objetivos concretos se pueden detallar del siguiente modo:

1. Evaluar la capacidad de unión de diferentes ligandos procedentes de la proteína NS5B de HCV a varios subtipos de HLA-B*27 para establecer relaciones con las diferentes respuestas de células T observadas en pacientes.
2. Estudiar la afinidad de unión de diferentes ligandos de HRSV a distintos subtipos de HLA-B*27 con el propósito de hallar características comunes para la unión a todos los subtipos de esta familia.
3. Analizar la presentación y reconocimiento por células T CD8⁺ de epítomos de HLA de clase I procedentes de HRSV con el fin de determinar reglas generales sobre cómo se desarrolla la respuesta inmunológica frente a este virus.
4. Determinar la respuesta inmunológica frente a dos ligandos de *C. trachomatis* restringidos por HLA-B*27:05 y su posible reactividad cruzada con un ligando endógeno humano.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1 CULTIVOS CELULARES

1.1 Líneas celulares.

RMA-S es una línea celular deficiente en TAP que expresan el haplotipo múrido H-2^b [170]. En trabajos previos se han descrito líneas celulares RMA-S transfectadas que expresan las moléculas HLA-B*27:01 [171], -B*27:02 [171], -B*27:03 [172], -B*27:04 [173], -B*27:05 [174] o -B*27:06 [173]. También se ha descrito con anterioridad la línea transfectante que expresa HLA-A*02:01 [175].

T2 es una línea celular linfoide humana que carece completamente de la región genética del MHC de clase II, lo cual incluye los genes TAP. Como consecuencia esta línea expresa niveles muy reducidos de las moléculas HLA-A*02, -B*51 y -Cw1 en la superficie celular [176]. Las líneas celulares transfectadas que expresan las moléculas HLA-B*27:09 [177] o HLA-B*07:02 [178] se han descrito con anterioridad.

La línea celular adherente HEp-2 se consideró en un principio como derivada de un carcinoma de laringe. Sin embargo, estudios posteriores hallaron que se trata del producto de la contaminación cruzada entre las células originales y células de la línea HeLa [179].

1.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares en suspensión se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado.

Las células adherentes HEp-2 se cultivaron en medio DMEM suplementado. Para los diferentes pases de cultivo se utilizó tripsina-EDTA para separarlas, seguido de un lavado con PBS.

Las líneas celulares se mantuvieron en incubadores a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Se realizaron controles periódicos de infección por micoplasmas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las células se mantuvieron a largo plazo por criopreservación en tanques de nitrógeno líquido.

1.3 Cultivo de HRSV

El virus HRSV de la cepa Long se obtuvo a partir del sobrenadante de células HEp-2 infectadas, tal y como se ha descrito previamente [180]. El título viral se

adquirió a partir de las unidades formadoras de placas (p.f.u.s) obtenidas en ensayos de titulación por placas de lisis en células HEp-2.

2 REACTIVOS Y MEDIOS

2.1 Anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales PA2.1 (específico de la molécula HLA-A*02 [181]) y ME1 (específico para las moléculas HLA-B*27, -B*07 y -Bw22 [182]) se utilizaron para los marcajes de moléculas HLA en superficie. Dichos anticuerpos se obtuvieron a partir del sobrenadante generado mediante el cultivo de las correspondientes líneas celulares de hibridomas.

Además, se utilizaron diversos anticuerpos comerciales. En algunos experimentos se utilizó el anticuerpo isotípico de ratón IgG1 de eBioscience (San Diego, California, Estados Unidos) como control. El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), obtenido de AbD Serotec (Kidlington, Reino Unido), se utilizó como anticuerpo secundario en los ensayos de estabilidad de complejos péptido/MHC. El anticuerpo de rata anti-CD8 α de ratón (clon KT15) conjugado con FITC se adquirió de Proimmune (Oxford, Reino Unido) y se utilizó para los marcajes en células de bazo de los ratones. Para los ensayos ELISPOT se utilizaron dos tipos de anticuerpo de rata anti-IFN γ de ratón, uno de captura (clon R4-6A2) y otro biotinilado (clon XMG1.2), ambos adquiridos de BD Pharmigen (San Diego, California, Estados Unidos).

2.2 Péptidos sintéticos.

Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos (modelo 433; Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) y se purificaron posteriormente mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase reversa. La masa molecular de los péptidos se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF mientras que la composición química de los mismos se estableció mediante microcromatografía acoplada a espectrometría de masas en tándem (μ LC-MS/MS).

Los diferentes péptidos se nombran representados por el gen que codifica para la proteína de la cual proceden, acompañado de las posiciones de los residuos que ocupan dentro de dicha proteína.

2.3 Soluciones y medios.

Las siguientes soluciones y medios fueron utilizados en los diferentes experimentos:

PBS → Solución salina tamponada con fosfato: NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 2,7 mM.

PBS-T → PBS con el surfactante Tween 20 al 0,05% v/v.

Solución de Gey → Solución salina equilibrada de Gey: Na_2HPO_4 0,5M, KH_2PO_4 0,5M, CaCl_2 0,1M, MgCl_2 0,1M, KCl 0,1M, NH_4Cl 0,5M. Se utilizó en las suspensiones de bazo de ratones para la lisis específica de eritrocitos.

Tripsina-EDTA → Tripsina (Lonza) al 0,25% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich) al 0,02% p/v en PBS. Se utilizó para subcultivar las células adherentes.

Medio de congelación → Compuesto por FBS inactivado suplementado con un 5% v/v de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). Se utilizó para la congelación y criopreservación de las líneas celulares.

Solución PFA → Disolución de paraformaldehído (PFA; Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) al 0,5% v/v en PBS. Se utilizó para fijar las células antes de su análisis por citometría de flujo.

RPMI 1640 → Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (Lonza, Basilea, Suiza). Para el cultivo de las líneas celulares se utilizó suplementado con un 10% v/v de FBS inactivado por calor, 50 unidades/mL de los antibióticos penicilina y estreptomicina (Lonza) y 50 μM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). En los ensayos funcionales este medio se utilizó al 5% v/v de FBS.

DMEM → Medio Eagle modificado de Dulbecco (Lonza) suplementado con 4mM de glutamina (Lonza) y FBS al 10% v/v.

FBS → Suero bovino fetal (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania).

3 ENSAYOS DE ESTABILIDAD DE COMPLEJOS PÉPTIDO-MHC.

3.1 Ensayos de estabilidad de complejos péptido-HLA en líneas deficientes en TAP.

Las líneas transfectantes deficientes en TAP RMA-S y T2 poseen una muy baja expresión en superficie de las moléculas del MHC de clase I debido al defecto en el transporte de péptidos al retículo endoplasmático. Sin embargo, la expresión de las moléculas del MHC de clase I se puede rescatar mediante el cultivo a temperaturas

menores que la fisiológica de 37°C, en las cuales las moléculas del MHC emergen en la membrana plasmática vacías [6] o con péptidos de muy baja afinidad [40]. Al añadir experimentalmente péptidos sintéticos externos, las moléculas del MHC de clase I quedarán cargadas y estabilizadas en función de la afinidad de dichos péptidos por las moléculas presentadoras y la concentración de los mismos. Al recuperar la temperatura de 37°C, aquellos complejos péptido-MHC que no sean estables son introducidos de nuevo en el interior celular, mientras que aquellos con la suficiente estabilidad permanecen en la superficie celular de modo que pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos en marcajes de superficie.

Las líneas deficientes en TAP se incubaron a 26°C durante 16 horas para promover la expresión de las moléculas HLA de clase I en la membrana celular. Las células se lavaron con medio RPMI y se incubaron durante 2 horas a 26°C en medio RPMI sin FBS con distintas concentraciones de péptidos sintéticos para permitir la unión de los péptidos a las moléculas HLA de clase I. Posteriormente, las células se incubaron durante 2 horas adicionales a 37°C para facilitar la internalización de las moléculas del MHC inestables que no se hubieran unido apropiadamente a los péptidos. A continuación, las células se lavaron con medio RPMI y se incubaron durante 30 minutos con 100µL de los correspondientes sobrenadantes de cultivo de hibridoma (PA2.1 para HLA-A*02 o ME1 para HLA-B*27 y -B*07), seguido de un lavado con PBS y una posterior incubación de 30 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo FITC (tal y como se describe en [183]), lo que permitió su posterior análisis por citometría de flujo. Los datos se obtuvieron utilizando un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San José, California, Estados Unidos) y se analizaron mediante el programa especializado FACSDiva versión 6 (BD Biosciences).

Las células incubadas sin péptido exhibieron valores medios de intensidad del pico de fluorescencia similares al marcaje de fondo observado con anticuerpo secundario solo. Los resultados para cada péptido se obtuvieron en valores de concentración situados entre 0,01 y 200µM. Los índices de fluorescencia se calcularon como el cociente entre el valor medio del pico de fluorescencia obtenido para cada muestra y el adquirido en el control de incubación sin péptido. La afinidad de unión de los péptidos se expresó como la concentración efectiva media (EC₅₀), que es la concentración molar de péptido a la cual se obtiene un 50% del valor máximo del índice de fluorescencia obtenido en el péptido positivo. Por tanto, cuanto menor es este valor, mayor es la afinidad de unión de un péptido por la molécula HLA de clase I en cuestión.

3.2 Controles.

El péptido CMV pp65₂₉₄₋₃₀₂ (VAFTSHEHF, restringido por HLA-C*01:02) [184] de citomegalovirus se utilizó como control negativo para los ensayos de estabilidad de los complejos péptido-HLA de clase I.

En algunos ensayos con los diferentes subtipos de HLA-B*27 se utilizó el péptido Flu NP₃₈₃₋₃₉₁ (SRYWAIRTR, restringido por HLA-B*27) [185] del virus de la gripe como control positivo. En el caso de los subtipos en los que este péptido no se unía eficientemente se utilizó como control positivo el péptido sintético que mostraba mayor valor de unión a 200µM.

El péptido de unión a HLA-B*27:05 HIV gag p24, también conocido como KK10, procedente de la proteína gag p24 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV por sus siglas en inglés) [186] se utilizó como control adicional en los ensayos con péptidos sintéticos de HCV.

En los ensayos realizados con HLA-A*02:01 se utilizó el péptido VACV A10L₆₈₈₋₆₉₆ (ILDRIITNA, restringido por HLA-A*02) [187] de vaccinia como control positivo.

En los ensayos realizados con HLA-B*07:02 se utilizó el péptido VACV A34R₈₂₋₉₀ (LPRPDTRHL, restringido por HLA-B*07) [188] de vaccinia como control positivo.

4 MODELOS MÚRIDOS

4.1 Cepas.

Se utilizaron varias cepas de ratones transgénicos para diferentes moléculas HLA de clase I:

- HLA-A*02:01 [189]
- HLA-B*07:02 [178]
- HLA-B*27:05 [190]

También se utilizaron ratones C57BL/6 silvestres como control en los ensayos de inmunización con péptidos bacterianos de *C. trachomatis*.

4.2 Infecciones e inmunizaciones.

Todos los procedimientos de infección e inmunización se llevaron a cabo bajo anestesia por isofluorano para minimizar el sufrimiento de los animales.

En el caso de HRSV, los ratones se infectaron mediante inoculación intranasal de 1×10^6 unidades formadoras de placa (p.f.u.s) de la cepa Long del virus.

La inmunización de los ratones transgénicos para HLA-B*27:05 con emulsiones de péptidos sintéticos se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito con anterioridad [191]. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en la base de la cola con una emulsión en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma-Aldrich) de 100µg de los péptidos de la primasa de DNA de *C. trachomatis* (DNAP₂₁₁₋₂₂₁ o DNAP₂₁₁₋₂₂₃)

junto a 140µg del epít o po adyuvante de la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B (HBVc₁₂₈₋₁₄₀; TPPAYRPPNAPIL).

4.3 Preparación de suspensión de esplenocitos

Los ratones se sacrificaron a los siete días post-infección/inmunización mediante asfixia por CO₂. A cada ratón se le extrajo el bazo, el cual se disgregó sobre un cedazo para células de 40µm (BD Biosciences) para eliminar los restos tisulares. Los esplenocitos (células del bazo) fueron incubados durante 10 minutos a 4°C con solución de Gey con el objetivo de eliminar los glóbulos rojos de la muestra. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640, tras lo cual se procedió a su recuento en cámaras de Neubauer.

5 ELISPOT

5.1 ELISPOT.

Los ensayos ELISPOT (acrónimo en inglés para “Ensayo de puntos por inmunoadsorción ligado a enzimas”) *ex vivo* para detectar la activación específica de antígeno por IFNγ de células T CD8⁺ se llevaron a cabo como se ha descrito previamente en la literatura [192].

En primer lugar, las placas MultiScreen_{HTS} HA de 96 pocillos (Merck Millipore) se cubrieron con una disolución (7µg/mL) de anticuerpo de captura anti-IFNγ de ratón (clon R4-6A2) en PBS y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con medio RPMI 1640 y se bloquearon para prevenir adsorciones inespecíficas incubando cada pocillo con medio RPMI 1640 suplementado con un 10% v/v de FBS durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente, se prepararon cultivos con las suspensiones de células del bazo libres de eritrocitos de ratones infectados/inmunizados siete días antes (respuesta aguda). Se incubaron alrededor de 5 x 10⁶ esplenocitos por pocillo durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂ con los correspondientes péptidos sintéticos a una concentración final de 2,5 µM en un volumen final de 200µL de medio RPMI 1640.

Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces con PBS-T y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con una disolución en PBS de 2µg/mL del anticuerpo anti-IFNγ de ratón biotinilado (clon XMG1.2). Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron de nuevo con PBS-T cuatro veces y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una disolución en PBS de 0,6µg/mL de avidina conjugada con fosfatasa alcalina (ExtrAvidin® de Sigma-Aldrich). A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 50µL por pocillo de sustrato líquido BCIP/NBT® (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato conjugado con nitroazul

de tetrazolio, de Sigma-Aldrich) durante 10-30 minutos, hasta que se observó la aparición de puntos en los pocillos. Finalmente, las placas se lavaron varias veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para cuantificar las respuestas mediadas por IFN γ , se llevó a cabo un conteo de los puntos en los diferentes pocillos. Para ello, cada pocillo se fotografió utilizando un microscopio estereó EZ24 HD y el programa LAS EZ (ambos de Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El recuento de puntos se realizó sobre cada fotografía.

5.2 Marcaje de CD8.

Con el propósito de hallar el porcentaje de células CD8⁺ en cada bazo, se llevaron a cabo marcajes específicos de los esplenocitos libres de eritrocitos. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD8 α de ratón (clon KT15) conjugado con FITC (dilución 0,5 μ g/mL) durante 30 minutos, transcurridos los cuales los esplenocitos se lavaron con PBS y se fijaron en solución PFA. Los eventos se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y se analizaron mediante el programa FACSDiva versión 6 (BD Biosciences).

6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las secuencias de los dominios α 1 y α 2 de las cadenas pesadas de los diferentes alelos de HLA-B*27 se obtuvieron de Immuno Polymorphism Database (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/>). Las secuencias que representaban alelos nulos fueron eliminadas del análisis.

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó utilizando el algoritmo ClustalW, mientras que el análisis filogenético se realizó mediante el programa MEGA 7.0.21 [193], utilizando el método de unión de vecinos con corrección de Poisson para realizar el árbol filogenético.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.1 Prueba t de Student.

Para analizar la significancia estadística entre los resultados de índices de fluorescencia de los diferentes péptidos a 200 μ M se llevaron a cabo pruebas t de Student con datos desapareados. También se utilizó este test para analizar las diferencias en los resultados de los ensayos ELISPOT. Se consideraron

significativamente diferentes aquellos conjuntos de datos que mostraban valores $p < 0,05$.

7.2 Prueba χ^2 .

Las diferencias estadísticas entre las distribuciones de los ligandos de HLA de clase I a lo largo del genoma de HRSV se analizaron llevando a cabo pruebas de χ^2 (chi cuadrado). Se consideraron significativos los valores $p < 0,05$.

7.3 Ajuste por regresión lineal.

La relación entre diferentes parámetros de la respuesta frente a HRSV se analizó mediante modelos de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y la obtención del coeficiente de determinación r^2 .

VII. RESULTADOS

1 LA INMUNODOMINANCIA DE EPÍTOPOS PROCEDENTES DE LA PROTEÍNA NS5B DE HCV DEPENDE DEL POLIMORFISMO DE HLA-B*27

1.1 Las características de unión del epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ a los subtipos HLA-B*27:02 y -B*27:05 sugieren una explicación al reconocimiento diferencial de este epítipo en distintos pacientes.

El análisis detallado previo de la respuesta inmunológica celular frente a HCV reveló que los dos epítopos frente a los que reaccionaban las células T de la mayoría de los pacientes eran presentados por la molécula HLA-B*27:05. Por el contrario, el epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ se identificó únicamente en un paciente HLA-B*27:02⁺. Esta ausencia de reconocimiento no podía atribuirse a diferencias en la secuencia del epítipo, ya que ésta se encontraba conservada entre los diferentes genotipos y subtipos virales, y coincidía tanto en el paciente HLA-B*27:02⁺ como en los B*27:05⁺ (Tabla 1). Por ello, una hipótesis para explicar la respuesta diferencial frente a los epítopos de la proteína NS5B entre las diversas cohortes de pacientes podría radicar en la diferente capacidad de unión de los diferentes epítopos a los diversos subtipos de HLA-B*27. Para analizar esta hipótesis, se realizaron experimentos de estabilización de complejos péptido-HLA en células deficientes en TAP transfectadas con los distintos subtipos de HLA-B*27 implicados.

Tabla 1. Resumen de los ligandos de HCV utilizados en los ensayos de estabilización con los subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Proteína	Posición	Secuencia ^a
NS5B ₄₀₃₋₄₁₁	Polimerasa de RNA de HCV	403-411	ARHTPVNSW
NS5B ₄₂₄₋₄₃₂	Polimerasa de RNA de HCV	424-432	ARMILMTHF
NS5B ₅₁₉₋₅₂₇	Polimerasa de RNA de HCV	519-527	GRAAICGKY
CMV pp65 ^b	pp65 de citomegalovirus	294-302	VAFTSHEHF
Flu NP ^b	Nucleoproteína del virus de la gripe	383-391	SRYWAIRTR
HIV gag p24 ^b	Gag p24 de HIV	263-272	KRWIILGLNK

^a Todas las secuencias de los péptidos de HCV proceden del subtipo 1a.

^b Los péptidos CMV pp65 de citomegalovirus, Flu NP del virus de la gripe y HIV gag p24 de HIV se utilizaron como controles en los ensayos de estabilización de complejos péptido-HLA.

Los ensayos determinaron que los tres epítopos de HCV (NS5B₄₀₃₋₄₁₁, NS5B₄₂₄₋₄₃₂ y NS5B₅₁₉₋₅₂₇), así como el péptido control positivo HIV gag p24, se comportaban como ligandos de alta afinidad para HLA-B*27:02, con valores de EC₅₀ en el entorno de 10µM (Figura 10 y Tabla 2).

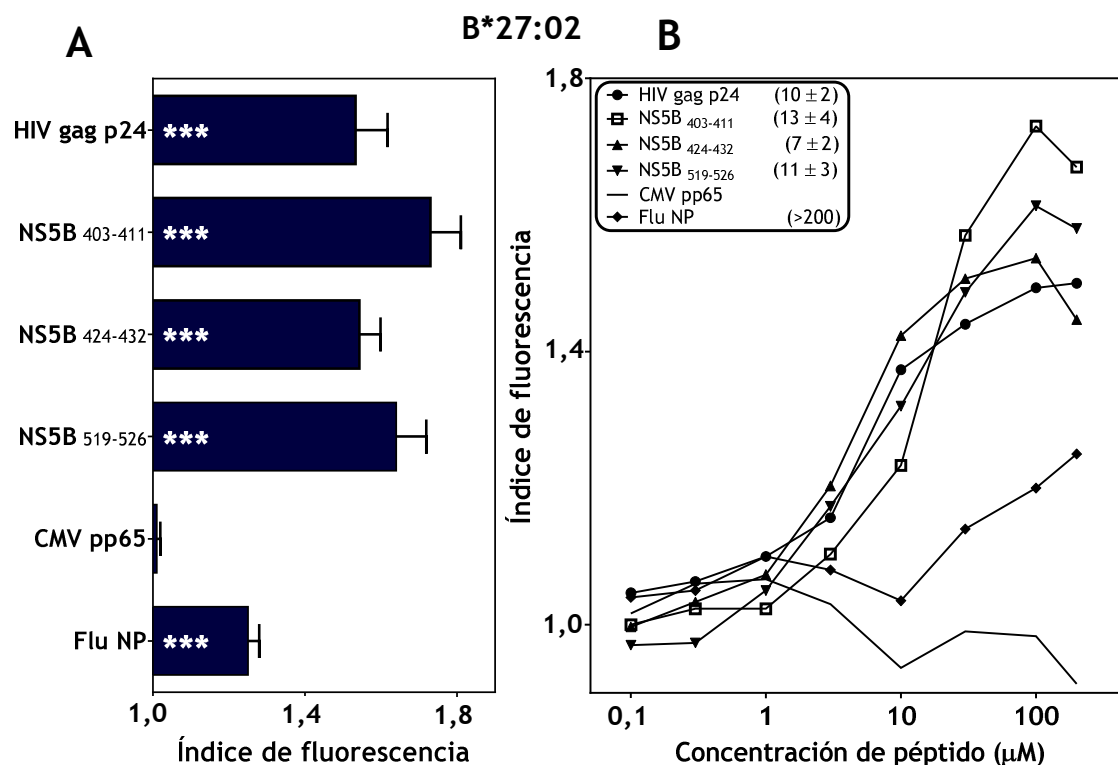


Figura 10. Estabilización de HLA-B*27:02 con ligandos sintéticos de HCV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:02 se obtuvo mediante el análisis por citometría de flujo de las células. **Panel A:** los péptidos indicados, detallados en la Tabla 1, se utilizaron a 200 μM . Los péptidos CMV pp65, Flu NP y HIV gag p24 se utilizaron como controles positivos o negativos. Los resultados, calculados como índices de fluorescencia, se representan como las medias \pm D.E. de tres experimentos independientes. Los valores p significativos ($p < 0,001$) frente al control negativo CMV pp65 se representan con tres asteriscos blancos. **Panel B:** Se muestran las curvas de titulación de los diferentes péptidos sintéticos con HLA-B*27:02. Los resultados representan los valores de la media obtenidos a partir de tres experimentos independientes. En la parte superior izquierda se representan los valores de la EC₅₀, expresados como media \pm D.E. en μM , para cada péptido.

Cuando se realizaron experimentos equivalentes para analizar la capacidad de unión de los péptidos virales al subtipo HLA-B*27:05 se observó que mientras que los valores de EC₅₀ indicaban que los péptidos NS5B 424-432 y NS5B 519-527 eran ligandos de alta afinidad, el péptido NS5B 403-411 se unía a HLA-B*27:05 con una EC₅₀ inferior de la que mostraba en su unión a la molécula B*27:02 (Figura 11 y Tabla 2).

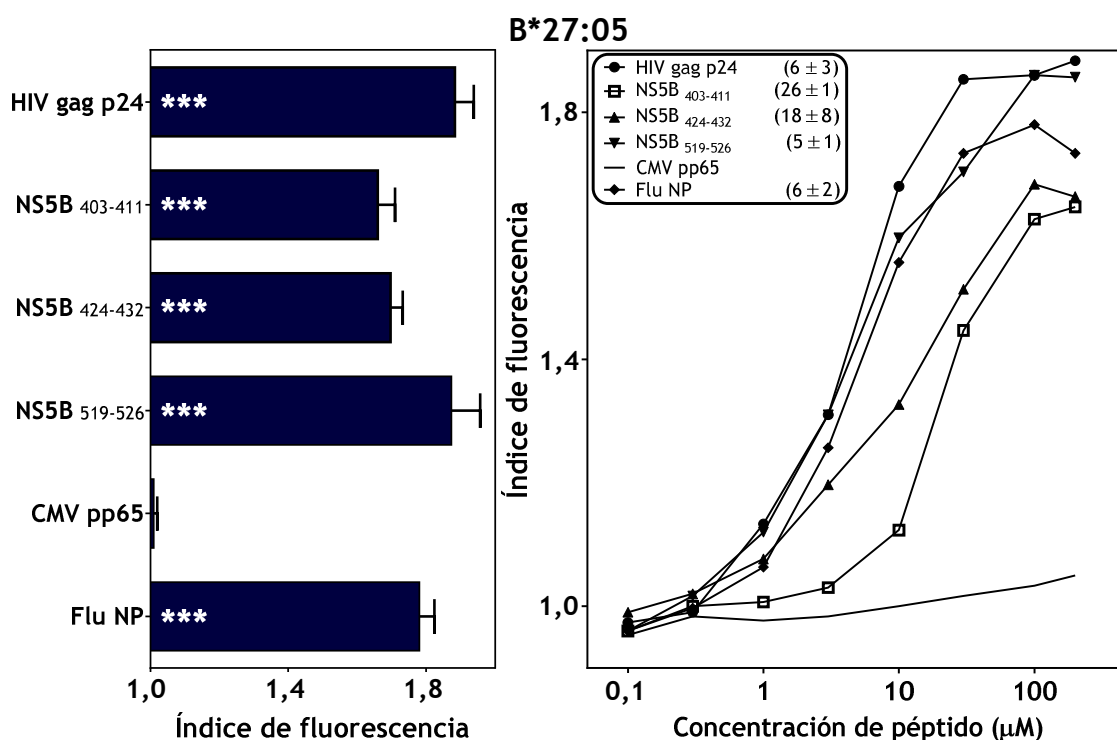


Figura 11. Estabilización de HLA-B*27:05 con ligandos sintéticos de HCV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-B*27:05 en la superficie celular de las células RMA-S transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres experimentos independientes.

Tabla 2. Resumen de los valores de afinidad para los ligandos de HCV en los diferentes subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Secuencia	B*27:02	B*27:05	B*27:04	B*27:06
NS5B ₄₀₃₋₄₁₁	ARHTPVNSW	13 ± 4	26 ± 1	19 ± 6	4 ± 1
NS5B ₄₂₄₋₄₃₂	ARMILMTHF	7 ± 2	18 ± 8	53 ± 15	2 ± 1
NS5B ₅₁₉₋₅₂₇	GRAAICGKY	11 ± 3	5 ± 1	15 ± 2	40 ± 3
HIV gag p24	KRWIILGLNK	10 ± 2^a	6 ± 3	32 ± 6	28 ± 5
Flu NP	SRYWAIRTR	> 200	6 ± 2	21 ± 1	26 ± 1

^a Los datos se muestran como la EC_{50} (μM) \pm D.E. y son la media de tres o cuatro experimentos diferentes. Los valores que indican péptidos de alta afinidad ($EC_{50} \leq 20 \mu M$) se encuentran resaltados en negrita.

Por tanto, el superior valor de afinidad del péptido NS5B₄₀₃₋₄₁₁ en B*27:02 respecto de B*27:05 sugieren una posible explicación al hecho de que el mencionado epítipo únicamente genera respuesta específica en el paciente portador de la molécula HLA-B*27:02, y no en el resto de los pacientes que expresan el alelo B*27:05.

1.2 La infección crónica por HCV en individuos HLA-B*27:02⁺ deriva en una mutación en el residuo en P2 de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ que impide la unión eficiente a la molécula HLA.

El posterior análisis de secuencias virales obtenidas en otros trece pacientes HLA-B*27:02⁺ con infección crónica por HCV del genotipo 1 determinó que en el 92% de los casos el epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ mostraba una sustitución conservativa del residuo de Arg en P2 por Lys (Figura 12A). En marcado contraste, este cambio sólo se observó en un único individuo de cincuenta y nueve pacientes B*27:05⁺ con infección crónica por HCV. Por todo ello, dicho cambio podría suponer una mutación de escape viral resultado de la presión selectiva que ejerce el reconocimiento específico de las células T CD8⁺ únicamente en los pacientes B*27:02⁺.

Para evaluar esta hipótesis, se llevaron a cabo nuevos experimentos de estabilización de complejos péptido-HLA-B*27:02 utilizando tanto el epítipo silvestre NS5B₄₀₃₋₄₁₁ como la versión mutada K₂-NS5B₄₀₃₋₄₁₁. Los datos obtenidos indicaron que la sustitución de Arg por Lys en el motivo de anclaje principal del epítipo afecta gravemente a la capacidad de unión del péptido mutado a la molécula HLA-B*27:02 (Figura 12).

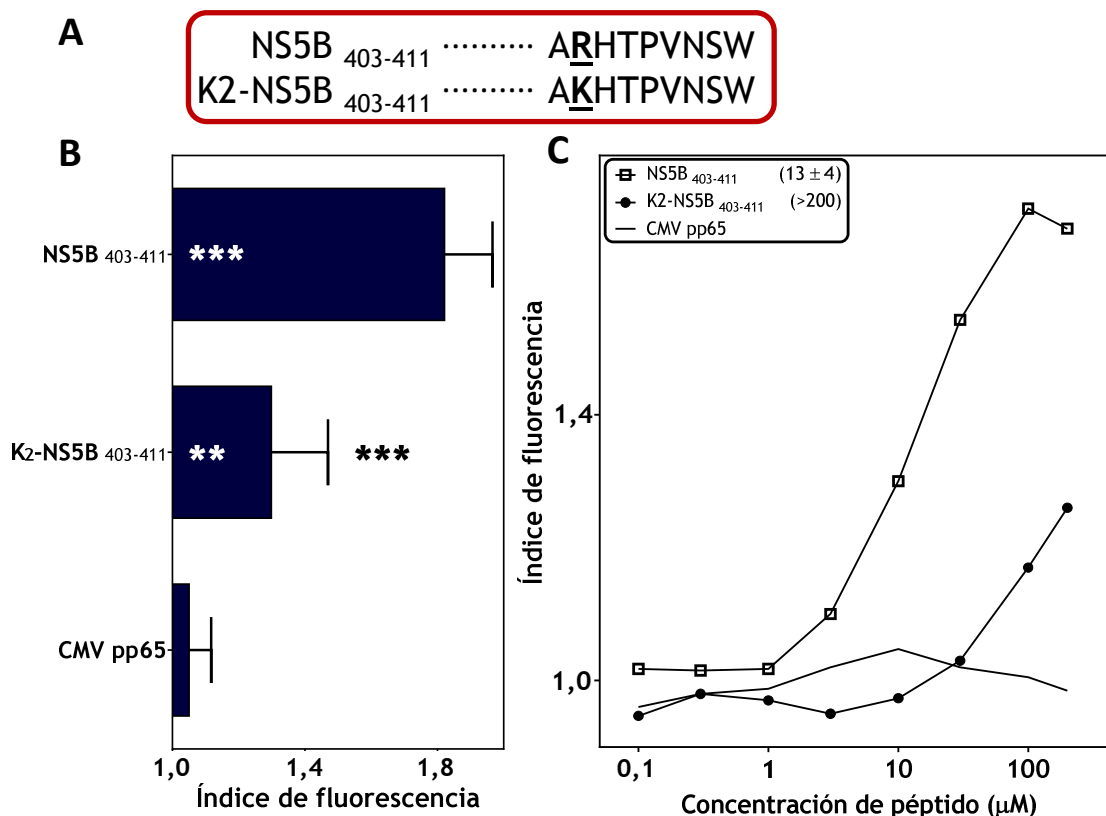


Figura 12. Estabilización de HLA-B*27:02 con el péptido NS5B₄₀₃₋₄₁₁ silvestre y su homólogo mutado en P2. **Panel A:** Secuencias del epítipo silvestre de HCV NS5B₄₀₃₋₄₁₁ y la versión mutada K₂-NS5B₄₀₃₋₄₁₁. El cambio de residuo entre las dos secuencias se representa en negrita y subrayado. **Panel B:** Se representan los datos para cinco experimentos independientes según las convenciones de la Figura 10A. Además, los valores estadísticamente diferentes entre el epítipo silvestre y el mutado se representan con asteriscos negros (**, p < 0,01; ***, p < 0,001). **Panel C:** Se representan los datos para cuatro experimentos independientes de acuerdo a lo indicado en la Figura 10B.

En resumen, estos datos indicarían que el cambio en P2 en el epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ detectado en los pacientes B*27:02⁺ sería una probable mutación de escape de HCV que evitaría el reconocimiento por parte de los CTLs, lo que explicaría en parte la cronificación de la infección viral en los pacientes.

1.3 Los perfiles de unión de los diferentes epítipos de la proteína viral NS5B a los subtipos HLA-B*27:04 y -B*27:06 sugieren probables diferencias en la inmunodominancia de la respuesta inmunológica antiviral.

Los alelos B*27:04 y B*27:06 se encuentran ampliamente distribuidos en la población del sureste asiático y del archipiélago indonesio, respectivamente, donde son los subtipos más frecuentes de la familia HLA-B*27 (Figura 4). El polimorfismo en estos subtipos respecto a B*27:05 afecta a residuos que, por encontrarse en el sitio de unión al antígeno (Figura 3), podrían alterar la capacidad de unión de los tres epítipos de HCV. Por ello, se realizaron nuevos ensayos de estabilización de complejos de los péptidos virales con las moléculas HLA-B*27:04 y -B*27:06.

En el caso de HLA-B*27:04, los tres ligandos de HCV estabilizaban las moléculas HLA en la superficie de las células deficientes en TAP, si bien solamente los péptidos NS5B₄₀₃₋₄₁₁ y NS5B₅₁₉₋₅₂₆ se mostraron como ligandos de alta afinidad mientras que con el epítipo inmunodominante en HLA-B*27:05 NS5B₄₂₄₋₄₃₂ se obtuvieron valores de EC₅₀ superiores a 50μM (Figura 13 y Tabla 2). Esta afinidad intermedia sugiere que este epítipo podría ceder relevancia como diana para los linfocitos T CD8⁺ en poblaciones HLA-B*27:04⁺.

Los datos obtenidos en los ensayos realizados con los péptidos virales en células deficientes en TAP transfectadas con HLA-B*27:06 revelaron que, mientras que NS5B₅₁₉₋₅₂₆ mostraba una afinidad intermedia por las moléculas HLA de clase I, NS5B₄₀₃₋₄₁₁ y NS5B₄₂₄₋₄₃₂ eran ligandos de alta afinidad para HLA-B*27:06 (Figura 14 y Tabla 2). Debido a su superior capacidad de unión a la molécula HLA de clase I, probablemente estos dos epítipos podrían ser los que cobren mayor importancia en la respuesta de células T CD8⁺ en pacientes orientales HLA-B*27:06⁺.

Como conclusión, los datos obtenidos en los subtipos B*27:04 y B*27:06 sugieren que la inmunodominancia de los epítipos descritos en la proteína NS5B de HCV podría verse alterada por las diferencias en la capacidad de unión de los péptidos a las moléculas presentadoras de clase I. De hecho, los resultados indican que el péptido NS5B₄₀₃₋₄₁₁, asociado en un principio a HLA-B*27:02, podría ser también importante en la respuesta restringida por los subtipos B*27:04 y B*27:06, ya que en ellos se muestra como un ligando de alta afinidad.

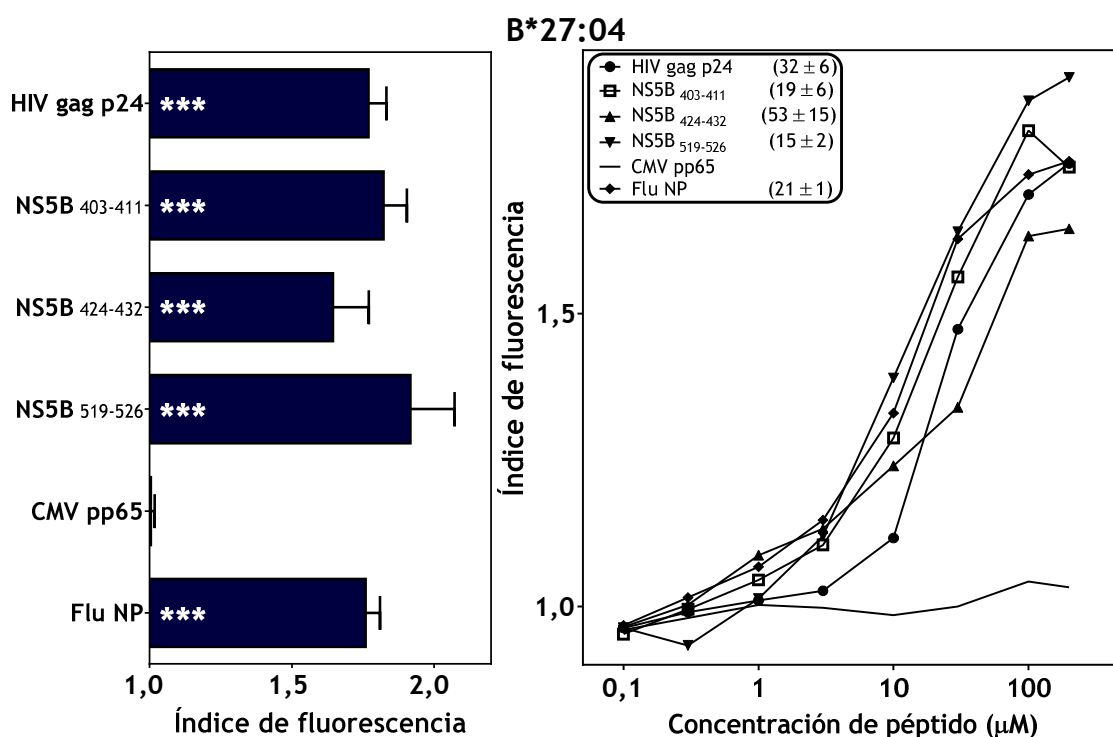


Figura 13. Estabilización de HLA-B*27:04 con ligandos sintéticos de HCV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-B*27:04 en la superficie celular de las células RMA-S transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

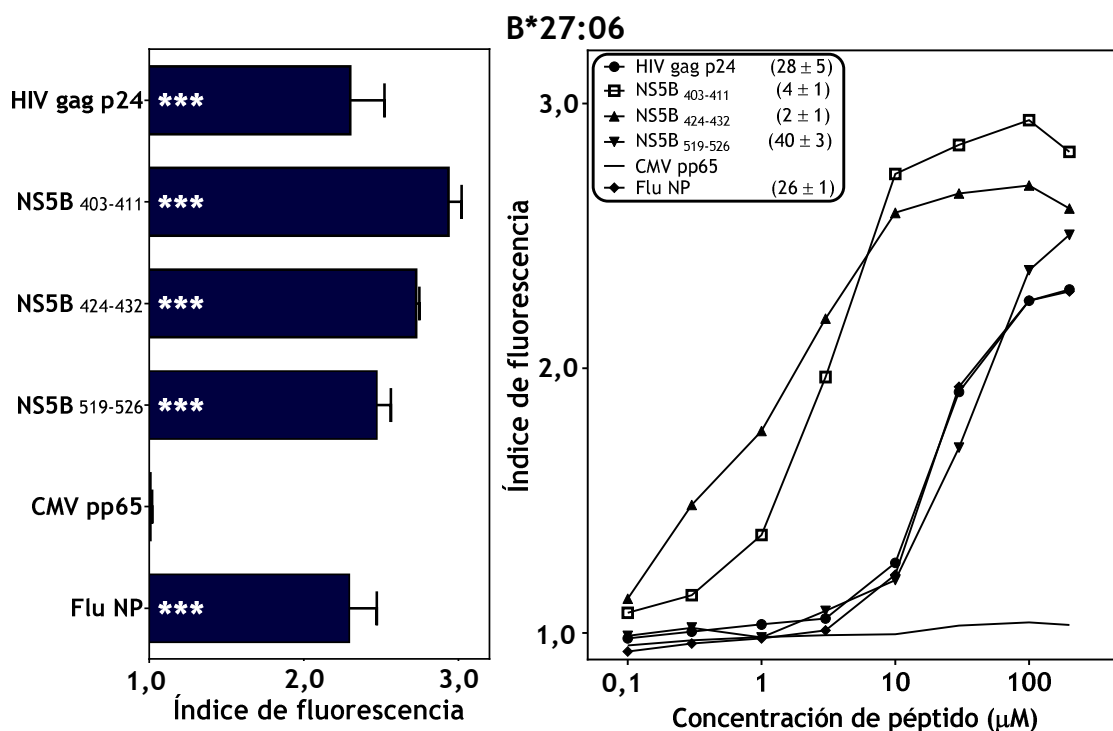


Figura 14. Estabilización de HLA-B*27:06 con ligandos sintéticos de HCV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-B*27:06 en la superficie celular de las células RMA-S transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10, y muestran los valores de las medias obtenidos de tres experimentos independientes.

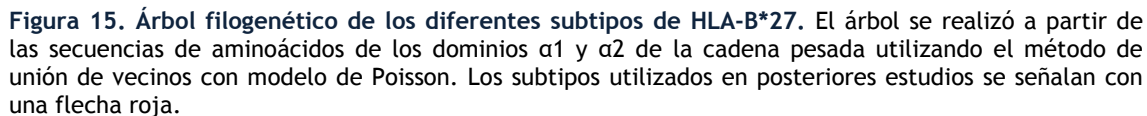
2 UN MOTIVO DE ANCLAJE MÍNIMO COMÚN PARA LOS LIGANDOS DE LAS MOLÉCULAS DE LA FAMILIA HLA-B*27

2.1 El análisis filogenético del grupo alélico HLA-B*27 permite la selección de diversos subtipos funcionalmente diferentes.

Tal y como se ha descrito en la sección anterior, el polimorfismo de las moléculas HLA-B*27 puede influir de manera importante en las características de unión a los ligandos peptídicos específicos. Así, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral consistió en buscar una estructura mínima en los péptidos que garantice su presentación por prácticamente todos los subtipos de la familia HLA-B*27.

En primer lugar, se realizó un estudio filogenético para determinar las relaciones funcionales entre los diferentes alelos de HLA-B*27. Para ello, se utilizaron las 156 secuencias de los subtipos de HLA-B*27 disponibles hasta la fecha, excluyendo los alelos nulos HLA-B*27:59, -B*27:64, -B*27:65, -B*27:66 y -B*27:94, y el subtipo HLA-B*27:22 (que tras una nueva secuenciación se determinó como idéntico al subtipo HLA-B*27:06). Únicamente se seleccionaron las secuencias de aminoácidos comprendidas entre los residuos 1 y 182, correspondientes a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada, debido a dos motivos: uno es que ésta es la región donde se concentra el polimorfismo en las moléculas del MHC de clase I [11], pero la razón fundamental es que estos dominios conforman el sitio de unión al antígeno (Figura 3A). Es por ello que los cambios de secuencia en estos dominios son los que determinan la especificidad de los ligandos.

Se realizó el alineamiento de las 150 secuencias seleccionadas y se obtuvo un árbol filogenético utilizando el método de unión de vecinos con modelo de Poisson. El resultado se muestra en la Figura 15, en la cual se observa que los seis subtipos de HLA-B*27 “clásicos” descritos previamente en la bibliografía (desde B*27:01 hasta B*27:06) se encuentran distribuidos por todo el árbol filogenético, por lo que fueron seleccionados como representativos para llevar a cabo los ensayos de estabilización de complejos de péptidos con moléculas HLA. Además, para este estudio también se incluyó el subtipo HLA-B*27:09 debido a que se trata de uno de los alelos más comunes en la población HLA-B*27⁺ y que es el único, junto a B*27:06, que se considera protector frente a la SpA.



2.2 Los ligandos específicos de HRSV se unen a la molécula B*27:05 con un amplio rango de afinidades.

60

Tabla 3. Resumen de los ligandos de HRSV utilizados para los ensayos de estabilización en HLA-B*27.

Péptido ^a	Proteína	Posición	Secuencia
L ₂₀₈₉₋₂₀₉₇	Polimerasa	2089-2097	GRNEVFSNK
M ₇₆₋₈₄	Proteína de la matriz	76-84	SRSALLAQM
M ₁₆₉₋₁₇₇	Proteína de la matriz	169-177	VRNKDLNTL
M2 ₁₅₀₋₁₅₉	Proteína de la matriz 2-1	150-159	KRLPADVLKK
NP ₁₀₀₋₁₀₉	Nucleoproteína	100-109	HRQDINGKEM
NP ₁₈₄₋₁₉₄	Nucleoproteína	184-194	RRANNVLKNEM
NP ₁₉₅₋₂₀₅	Nucleoproteína	195-205	KRYKGLLPKDI
NS2 ₃₇₋₄₅	Proteína no estructural 2	37-45	HRFIYLINH
P ₁₉₈₋₂₀₈	Fosfoproteína	198-208	LRNEESEKMAK
CMV pp65	pp65 de citomegalovirus	294-302	VAFTSHEHF
Flu NP	Nucleoproteína del virus de la gripe	383-391	SRYWAIRTR

^a Todos los péptidos derivan de la secuencia de la cepa Long de HRSV excepto CMV pp65₂₉₄₋₃₀₂ y Flu NP₃₈₃₋₃₉₁, los cuales se utilizaron como control negativo y positivo, respectivamente, para los ensayos de unión a HLA-B*27:05.

Inicialmente se llevaron a cabo experimentos de estabilidad de los complejos MHC/péptido utilizando células RMA-S deficientes en TAP transfectadas con la molécula HLA-B*27:05. En la Figura 16 se muestra el histograma obtenido en un experimento representativo realizado con dos péptidos de HRSV (M2₁₅₀₋₁₅₉ y P₁₉₈₋₂₀₈), junto a los péptidos CMV pp65 de citomegalovirus y el epítipo del virus de la gripe Flu NP (restringido por HLA-B*27:05), utilizados como control negativo y positivo respectivamente.

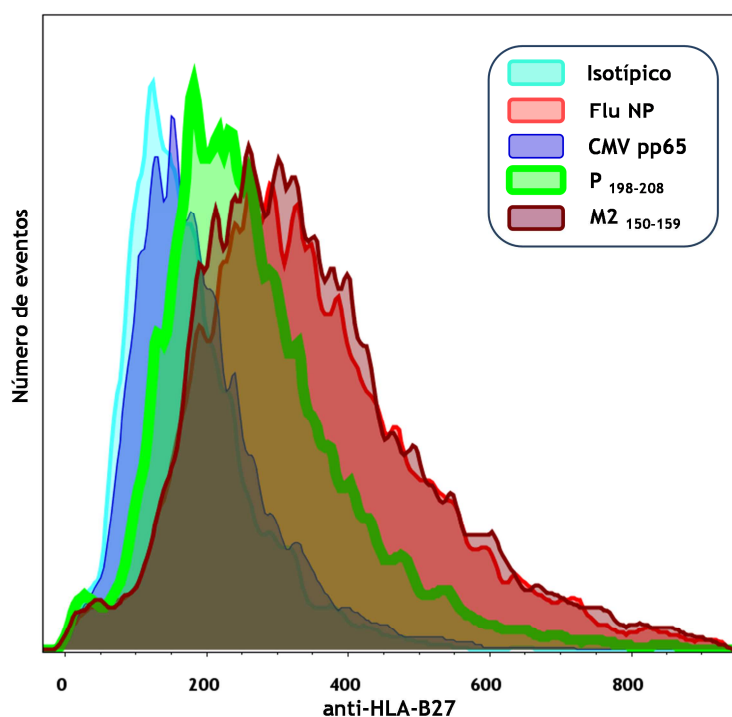


Figura 16. Ensayo representativo de estabilización de complejos de HLA-B*27:05 con péptidos sintéticos. La figura muestra los perfiles de citometría de flujo obtenido al marcar con el anticuerpo monoclonal ME1 células RMA-S deficientes en TAP transfectadas con HLA-B*27:05 que habían sido incubadas previamente con los péptidos indicados en la leyenda a una concentración de 200 μ M.

Cuatro de los péptidos sintéticos de HRSV utilizados (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇, M2₁₅₀₋₁₅₉, NP₁₀₀₋₁₀₉ y NP₁₈₄₋₁₉₄) estabilizaron los complejos de superficie péptido-HLA de forma similar al péptido Flu NP, utilizado como control positivo (Figura 17A y Tabla 4). Para los otros cinco péptidos sintéticos de HRSV (M₇₆₋₈₄, M₁₆₉₋₁₇₇, NP₁₉₅₋₂₀₅, NS2₃₇₋₄₅ y P₁₉₈₋₂₀₈), la inducción de complejos de superficie HLA-péptido fue algo inferior que el control positivo (Figura 17A y Tabla 4).

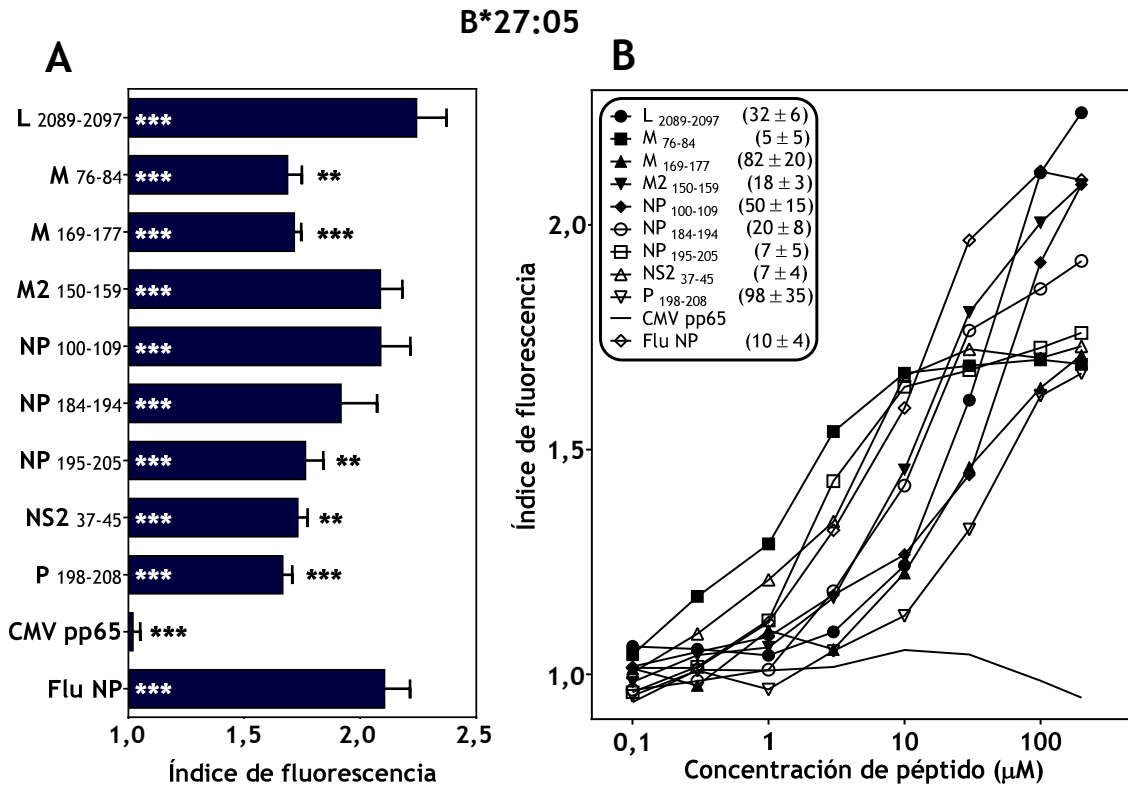


Figura 17. Estabilización de HLA-B*27:05 con ligandos sintéticos de HRSV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-B*27:05 en la superficie celular de las células RMA-S transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes. Asimismo, los valores p significativos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) frente a los controles negativo o positivo se representan con asteriscos blancos o negros, respectivamente.

Tabla 4. Resumen de los ensayos de estabilización de HLA-B*27 con ligandos sintéticos de HRSV.

Péptido	Secuencia	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
L 2089-2097	GRNEVFSNK	2,2 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
M 76-84	SRSALLAQM	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,4	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
M 169-177	VRNKDLNTL	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1
M2 150-159	KRLPADVLKK	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1
NP 100-109	HRQDINGKEM	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
NP 184-194	RRANNVLKNEM	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
NP 195-205	KRYKGLLPKDI	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,4	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
NS2 37-45	HRFIYLINH	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1
P 198-208	LRNEESEKMAK	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
CMV pp65	VAFTSHEHF	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Flu NP	SRYWAIRTR	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1

^a Los datos son medias de tres a cinco experimentos independientes y se muestran como el índice de fluorescencia a una concentración de péptido de 200μM ± D.E.

Asimismo, se determinó la afinidad relativa de la molécula HLA de clase I B*27:05 para cada uno de los péptidos de HRSV mediante el cálculo de los valores de la EC_{50} , lo que permitió agrupar a los diferentes ligandos como péptidos de afinidad alta (M_{76-84} , $M2_{150-159}$, $NP_{184-194}$, $NP_{195-205}$ y $NS2_{37-45}$), media ($L_{2089-2097}$ y $NP_{100-109}$) o baja ($M_{169-177}$ y $P_{198-208}$) por la molécula HLA-B*27:05 (Figura 17B y Tabla 5), tal y como ocurre comúnmente entre los ligandos naturales de HLA-B*27:05.

Tabla 5. Valores de afinidad para los ligandos de HRSV en los diferentes subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Secuencia	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
$L_{2089-2097}$	GRNEVFSNK	32 ± 6^a	71 ± 28	169 ± 57	>200	68 ± 24	-	>200
M_{76-84}	SRSALLAQM	5 ± 5	6 ± 3	15 ± 6	1 ± 1	6 ± 2	15 ± 11	>200
$M_{169-177}$	VRNKDLNTL	82 ± 20	>200	56 ± 16	3 ± 1	19 ± 7	>200	94 ± 25
$M2_{150-159}$	KRLPADVLKK	18 ± 3	78 ± 10	73 ± 9	>200	22 ± 9	-	136 ± 63
$NP_{100-109}$	HRQDINGKEM	50 ± 15	96 ± 43	67 ± 27	3 ± 2	24 ± 7	>200	132 ± 53
$NP_{184-194}$	RRANNVLKNEM	20 ± 8	60 ± 29	19 ± 10	2 ± 1	7 ± 1	39 ± 9	43 ± 27
$NP_{195-205}$	KRYKGLLPKDI	7 ± 5	20 ± 11	16 ± 3	1 ± 1	7 ± 2	8 ± 1	9 ± 1
$NS2_{37-45}$	HRFIYLINH	7 ± 4	10 ± 5	78 ± 33	45 ± 19	33 ± 9	-	77 ± 14
$P_{198-208}$	LRNEESEKMAK	98 ± 35	>200	-	>200	89 ± 12	-	-
Flu NP	SRYWAIRTR	10 ± 4	23 ± 3	19 ± 9	18 ± 4	26 ± 3	-	>200

^a Los datos se muestran como la EC_{50} (μM) \pm D.E. de tres a cinco experimentos diferentes. Los valores de afinidad que indican péptidos de afinidad intermedia ($20 \mu M > EC_{50} > 60 \mu M$) están señalados en negrita y los valores que indican péptidos de alta afinidad ($EC_{50} \leq 20 \mu M$) se encuentran, además, subrayados. Un guion (-) indica ausencia de diferencia estadística en el índice de fluorescencia en comparación con el control negativo.

2.3 El cambio Tyr59His en la subcavidad A del sitio de unión al antígeno induce una disminución moderada en la unión a HLA-B*27 de los ligandos de HRSV.

La molécula HLA-B*27:03 difiere del subtipo prototípico B*27:05 en un único cambio de aminoácido en la posición 59 de la cadena pesada de la molécula del MHC, el cual se encuentran involucrado en el anclaje del extremo N-terminal del péptido a la subcavidad A de la molécula de clase I (Figura 3). Los ensayos de estabilidad de los complejos péptido/MHC utilizando células RMA-S transfectadas con la molécula HLA-B*27:03 determinaron, con respecto a los valores obtenidos en B*27:05, tanto una ausencia de efecto para tres péptidos sintéticos de HRSV (M_{76-84} , $NP_{195-205}$ y $NS2_{37-45}$) como un descenso moderado en los valores de EC_{50} para seis de los ligandos de HRSV ($L_{2089-2097}$, $M_{169-177}$, $M2_{150-159}$, $NP_{100-109}$, $NP_{184-194}$ y $P_{198-208}$) como consecuencia del mencionado cambio Tyr59His (Figura 18 y Tablas 4 y 5).

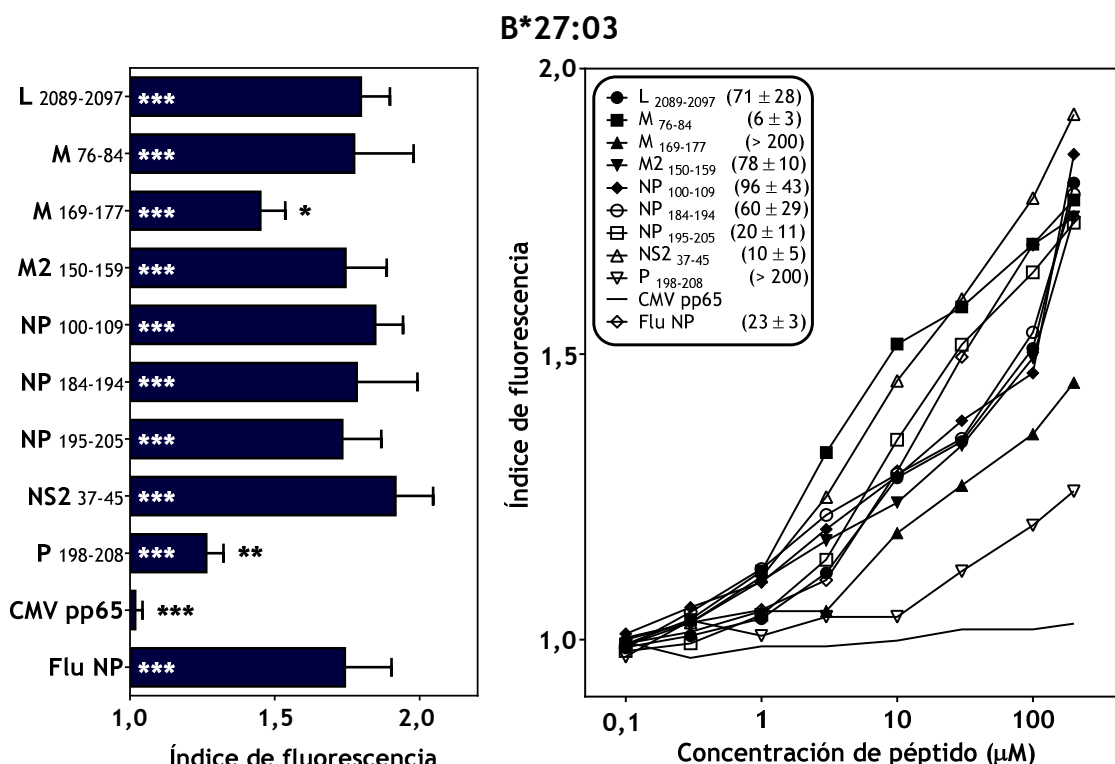


Figura 18. Estabilización de HLA-B*27:03 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:03 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.4 Los residuos C-terminales básicos, a diferencia de los apolares, reducen la unión a la molécula B*27:04 de los ligandos virales restringidos por HLA-B*27:05.

El subtipo B*27:04 se diferencia de la molécula B*27:05 en dos cambios en los residuos 77 (Asp por Ser) y 152 (Val por Glu) que afectan a las subcavidades E y F del sitio de unión al antígeno (Figura 3). Respecto a B*27:05, los efectos de estos cambios apenas afectaron a la unión a HLA-B*27:04 en las células RMA-S transfectadas de los cinco péptidos sintéticos de HRSV que poseen aminoácidos no polares en PQ (M₇₆₋₈₄, M₁₆₉₋₁₇₇, NP₁₀₀₋₁₀₉, NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅; Figura 19 y Tablas 4 y 5). Sin embargo, los tres ligandos de HRSV que contienen residuos básicos en PQ (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇, M2₁₅₀₋₁₅₉ y NS2₃₇₋₄₅) mostraron un ligero descenso en la afinidad a B*27:04 respecto a B*27:05. Es más, P₁₉₈₋₂₀₈, el ligando de baja afinidad para la molécula B*27:05, no se unió en absoluto al subtipo B*27:04 (Figura 19 y Tablas 4 y 5).

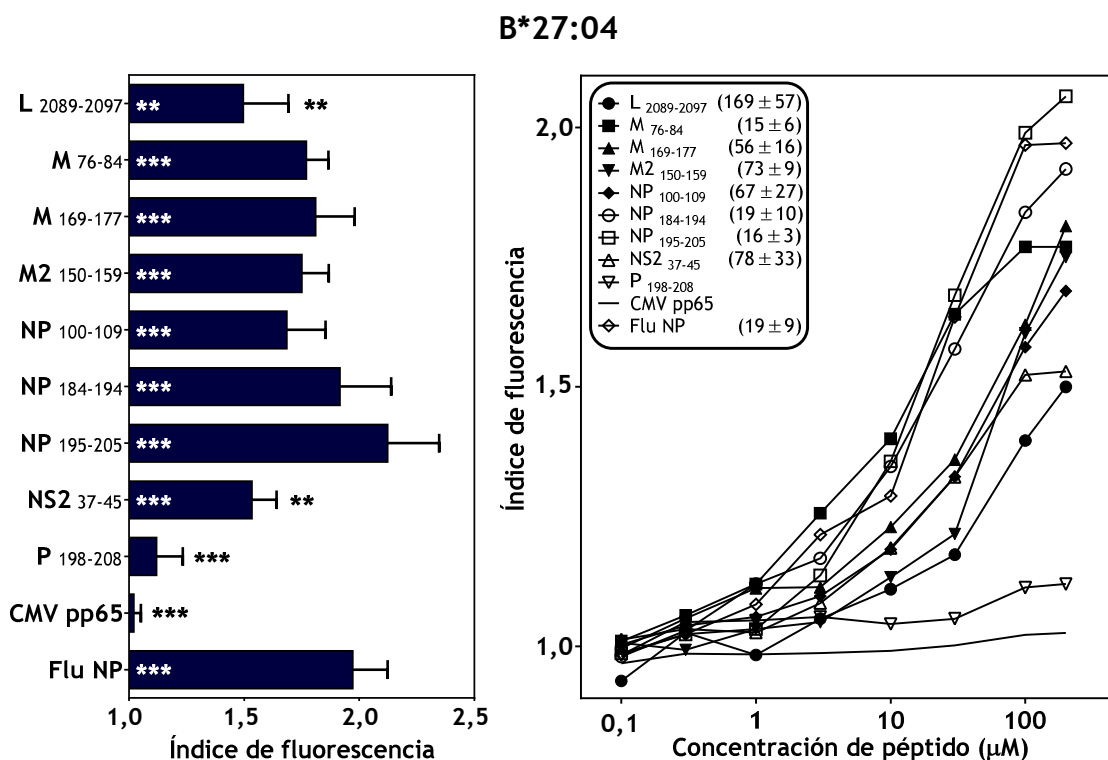


Figura 19. Estabilización de HLA-B*27:04 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:04 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.5 Los ligandos de HRSV restringidos por HLA-B*27:05 con residuos no polares en PQ exhiben alta afinidad de unión a B*27:06.

HLA-B*27:04 y -B*27:06 difieren entre sí en dos cambios en sus respectivas secuencia de aminoácidos, His114Asp y Asp116Tyr, ambos localizados en la misma cadena de la superficie con estructura de lámina β y orientados hacia el sitio de unión al antígeno en la molécula HLA-B*27 (Figura 3). Estos cambios estabilizan en el rango de μM la unión a B*27:06 de los cinco ligandos que presentan residuos apolares en posición C-terminal (M₇₆₋₈₄, M₁₆₉₋₁₇₇, NP₁₀₀₋₁₀₉, NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅) (Figura 20 y Tablas 4 y 5). Por el contrario, se observó un ligero aumento (NS2₃₇₋₄₅ y P₁₉₈₋₂₀₈) o descenso (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇ y M2₁₅₀₋₁₅₉) en la afinidad de los péptidos virales que contenían aminoácidos básicos en PQ en comparación con los valores obtenidos para B*27:04. Por tanto, los residuos en PQ pueden ser utilizados como motivos de anclaje adicionales en los ligandos de B*27:06.

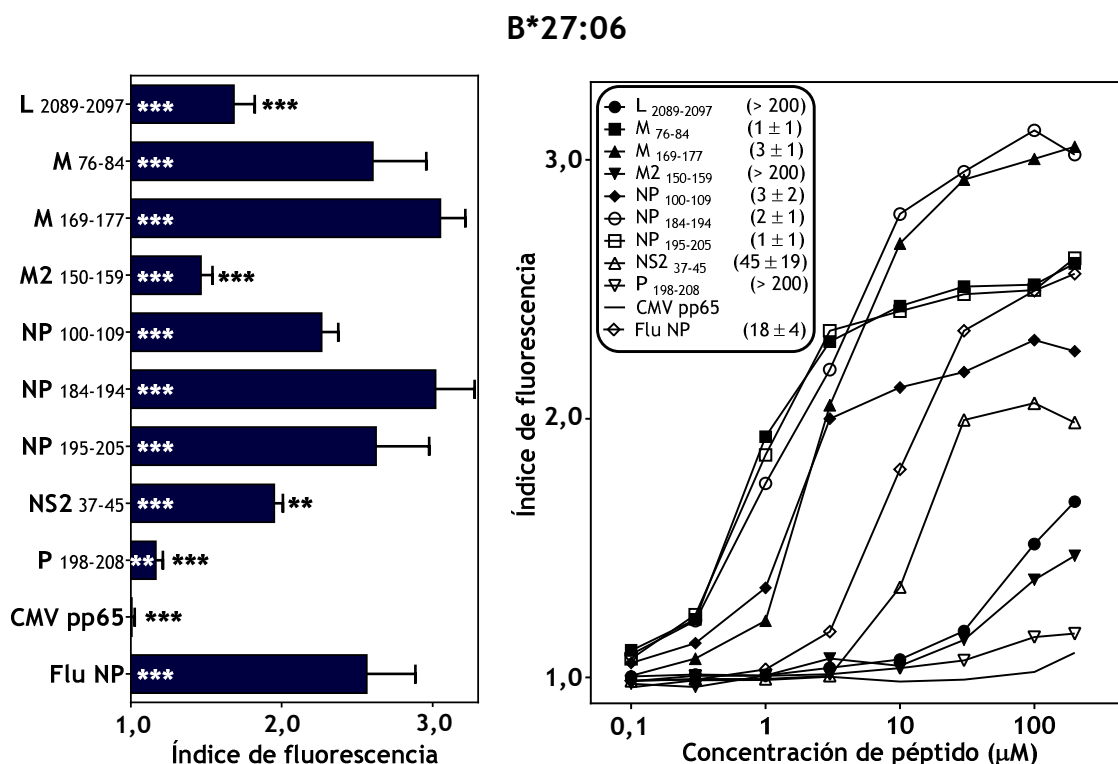


Figura 20. Estabilización de HLA-B*27:06 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:06 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.6 Los péptidos virales con residuos C-terminales apolares muestran alta afinidad de unión al subtipo B*27:09.

B*27:09 se diferencia de B*27:05 por el único cambio Asp116His, que se localiza, como ocurre en B*27:06, en el fondo de lámina B en el sitio de unión al antígeno de HLA-B*27 (Figura 3). Este polimorfismo permitió la unión estable de los cinco ligandos de HRSV que poseen residuos no polares en PQ: M₇₆₋₈₄, M₁₆₉₋₁₇₇, NP₁₀₀₋₁₀₉, NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅ (Figura 21 y Tablas 4 y 5). Por otro lado, el cambio en la posición 116 produjo un descenso moderado en la afinidad observada respecto a B*27:05 para los péptidos de HRSV que contenían aminoácidos básicos en PQ (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇ y NS2₃₇₋₄₅), con la excepción de M2₁₅₀₋₁₅₉, en el cual el residuo C-terminal básico pudo estabilizar la unión a la molécula B*27:09 de forma similar a HLA-B*27:05. De este modo, los residuos apolares son suficientes para la unión eficiente a la molécula de clase I B*27:09.

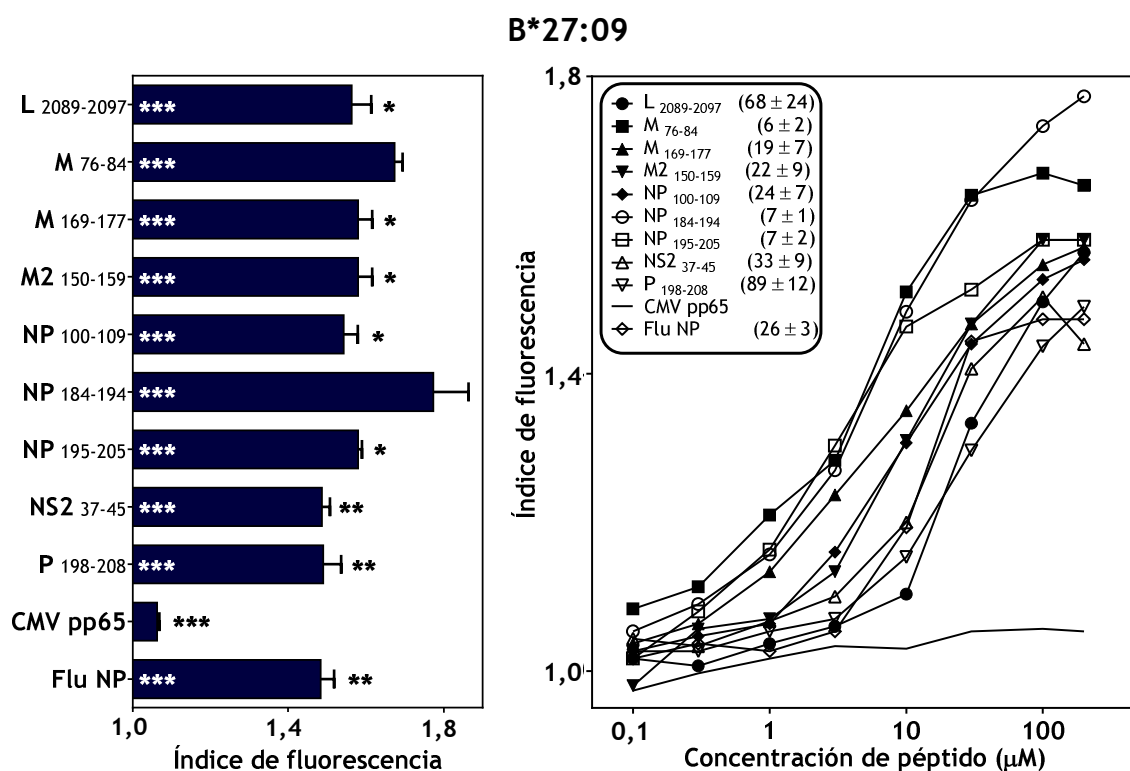


Figura 21. Estabilización de HLA-B*27:09 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células T2 transfectadas con HLA-B*27:09 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.7 Los residuos no polares en PQ de los ligandos virales de alta afinidad a B*27:05 conservan la capacidad de unión a la molécula B*27:01.

B*27:01 y B*27:05 se diferencian en tres sustituciones en la secuencia de la cadena pesada: Asp74Tyr, Asp77Asn y Leu81Ala. Estos residuos se localizan en la cavidad C/F del sitio de unión al antígeno (Figura 3). En los ensayos de estabilización en células B*27:01⁺ estos tres cambios impidieron la unión de todos los péptidos de HRSV con residuos básicos en PQ. Sin embargo, fueron capaces de estabilizar los complejos MHC-péptido aquellos ligandos virales con residuos apolares C-terminales, donde dos de ellos se mostraron como ligandos de muy baja afinidad (M₁₆₉₋₁₇₇ y NP₁₀₀₋₁₀₉), con EC₅₀ superiores a 200μM, mientras que los otros tres (M₇₆₋₈₄, NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅) se unieron a B*27:01 con una afinidad similar a la determinada frente al subtipo B*27:05 (Figura 22 y Tablas 4 y 5). Por tanto, los residuos apolares en PQ son necesarios, pero no suficientes, para la unión eficaz de los péptidos a la molécula B*27:01.

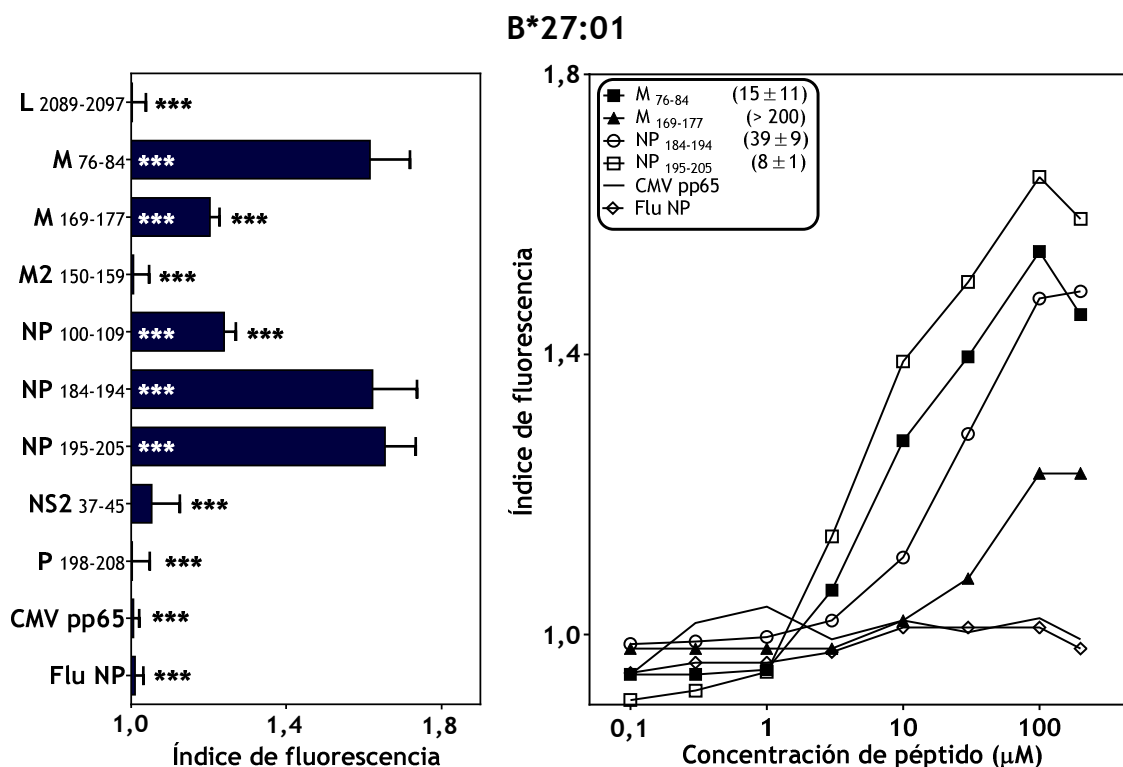


Figura 22. Estabilización de HLA-B*27:01 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:01 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.8 Los aminoácidos hidrofóbicos C-terminales, como leucina e isoleucina, mantienen la capacidad de unión al subtipo B*27:02 de los ligandos de HRSV restringidos por HLA-B*27:05.

El subtipo B*27:02 difiere de la molécula B*27:05 en tres cambios en la secuencia de aminoácidos, dos de ellos comunes con el subtipo B*27:01 (Asp77Asn y Leu81Ala) y otro exclusivo de este alelo (Thr80Ile). Por su localización dentro de la molécula HLA-B*27, estos cambios afectan a la subcavidad F del sitio de unión al antígeno (Figura 3). Únicamente con los dos ligandos de HRSV con Leu/Ile en PQ, M 169-177 y NP 195-205, se consiguieron niveles de estabilidad similar entre las moléculas B*27:02 y B*27:05 (Figura 23 y Tablas 4 y 5). Sin embargo, la afinidad de unión a B*27:02 descendió ligeramente para el péptido NP 184-194, y se redujo considerablemente para los otros seis ligandos virales (Figura 23 y Tablas 4 y 5). De esta forma, los residuos en PQ hidrofóbicos, como Leu/Ile, funcionarían como motivos de anclaje auxiliares adicionales a P2 para la unión al subtipo B*27:02.

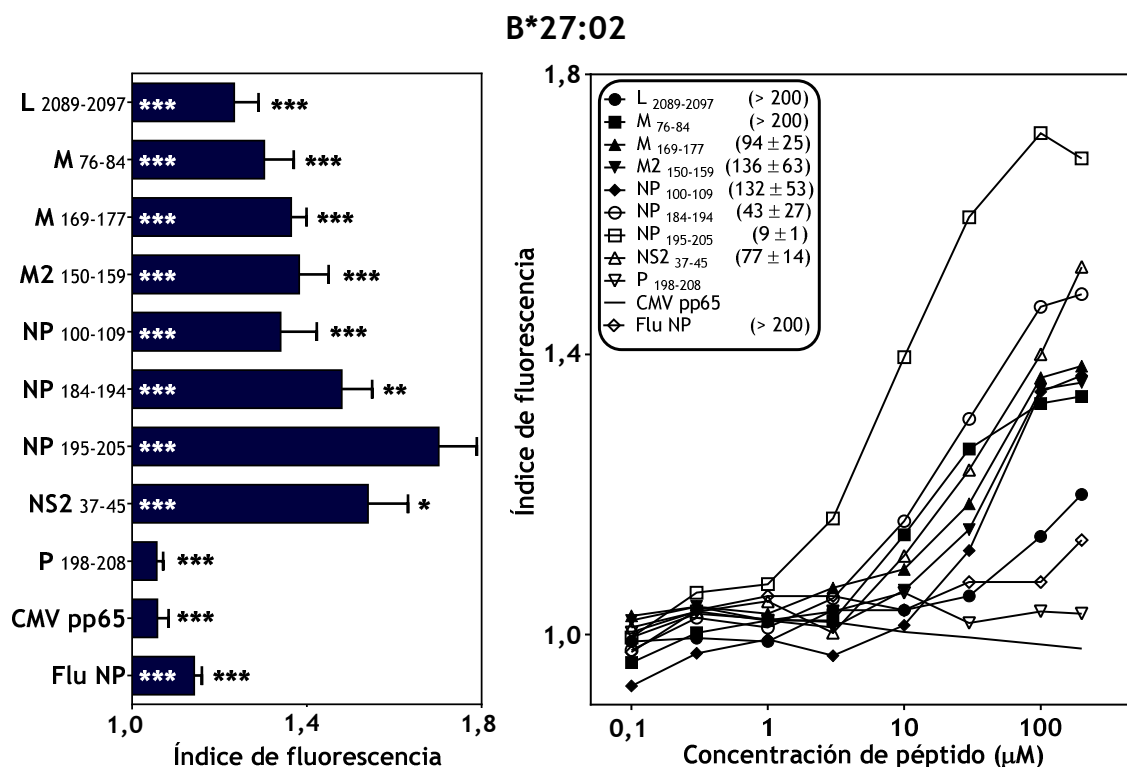


Figura 23. Estabilización de HLA-B*27:02 con ligandos sintéticos de HRSV. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:02 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

2.9 El análisis global de la afinidad de los diferentes péptidos sintéticos con los diversos subtipos de HLA-B*27 sugieren un motivo peptídico mínimo para la unión de ligandos a moléculas de esta familia.

El análisis de los datos anteriores muestra que la mayoría de los ligandos de HRSV se unieron a varios subtipos de HLA-B*27, a pesar de los cambios entre los diferentes alelos que afectan a los residuos del sitio de unión al antígeno; no obstante, sólo dos de los ligandos estudiados (NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅) se unieron eficazmente a los siete subtipos de HLA-B*27 analizados. Ambos ligandos contienen aminoácidos básicos en el extremo N-terminal y una cadena lateral grande e hidrofóbica en los residuos C-terminales. Estas características, por tanto, permiten sugerir que la secuencia Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Lue/Met sería un motivo peptídico mínimo para la unión eficiente a los siete subtipos de HLA-B*27 y, dado que componen una muestra heterogénea del polimorfismo de HLA-B*27 (Figura 15), a virtualmente todo el conjunto de moléculas HLA-B*27.

2.10 La pérdida de los motivos de anclaje adicionales en los péptidos de alta afinidad NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅ afecta a la capacidad de unión de los análogos monosustituídos a varios subtipos de HLA-B*27.

Con el objetivo de valorar la contribución relativa de los motivos de anclaje auxiliares identificados en los dos péptidos que mostraron mayor afinidad para todos los subtipos, NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅, se realizaron ensayos de estabilidad en los diferentes subtipos de HLA-B*27 con análogos de estos ligandos que presentaban sustituciones por alanina en los residuos situados en P1 y PΩ (Tabla 6). Los resultados para cada subtipo se muestran en la Figura 24 (B*27:05), Figura 25 (B*27:03), Figura 26 (B*27:04), Figura 27 (B*27:06), Figura 28 (B*27:09), Figura 29 (B*27:01) y Figura 30 (B*27:02). Además, en la Tabla 6 se recoge un resumen de los ensayos de afinidad en estos péptidos monosustituídos con Ala.

En primer lugar, la modificación de los residuos en P1 en NP₁₉₅₋₂₀₅ no generó ningún efecto perjudicial para la unión a los diferentes subtipos. Sin embargo, la sustitución en esta posición de Arg por Ala en el péptido NP₁₈₄₋₁₉₄ provocó un descenso moderado pero significativo de la afinidad de unión a B*27:03 (Figura 25 y Tabla 6).

Adicionalmente, el cambio de metionina por alanina en PΩ tanto en NP₁₈₄₋₁₉₄ como en NP₁₉₅₋₂₀₅ impidió completamente la interacción con el subtipo B*27:01 (Figura 29 y Tabla 6). Asimismo, esta sustitución individual disminuyó significativamente la capacidad de unión del péptido A₁₁-NP₁₉₅₋₂₀₅ a B*27:02 (Figura 30 y Tabla 6).

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la modificación de los motivos de anclaje auxiliares de los ligandos de alta afinidad puede alterar la unión efectiva a ciertos subtipos, si bien para algunos subtipos no existe un efecto negativo probablemente por el efecto compensatorio de los residuos en otras posiciones.

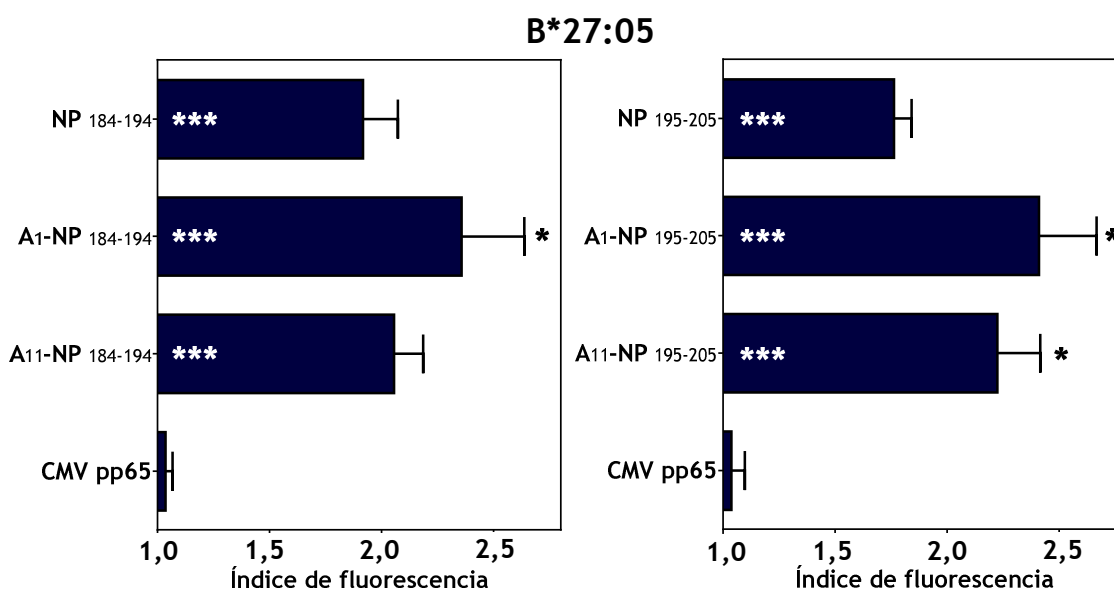


Figura 24. Estabilización de HLA-B*27:05 con análogos monosustituídos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:05 se obtuvo mediante el análisis por citometría de flujo de las células incubadas con los péptidos indicados a una concentración de 200μM. Los resultados se muestran como el índice de fluorescencia expresado como la media ± D.E. de tres a cinco experimentos. En el panel de la izquierda se representan los resultados utilizando péptidos análogos de NP₁₈₄₋₁₉₄, mientras que en el panel de la derecha se muestran los correspondientes a análogos de NP₁₉₅₋₂₀₅. Los valores p significativos se representan con * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) o *** ($p < 0,001$) y muestran diferencias estadísticamente significativas frente al péptido control negativo CMV pp65 (asteriscos blancos) o frente al ligando de HRSV original (asteriscos negros).

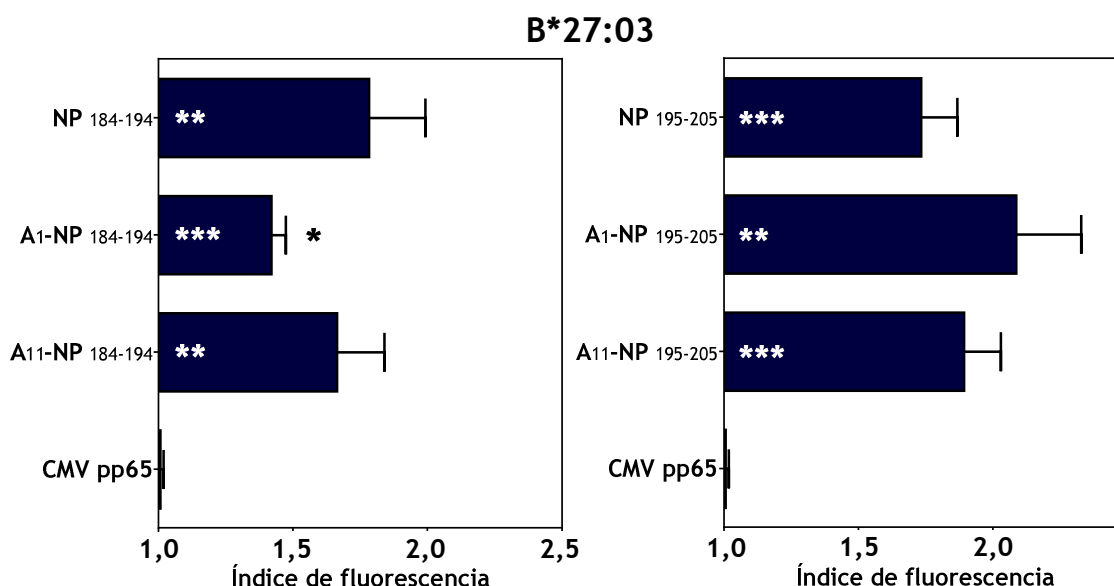


Figura 25. Estabilización de HLA-B*27:03 con análogos monosustituídos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:03 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

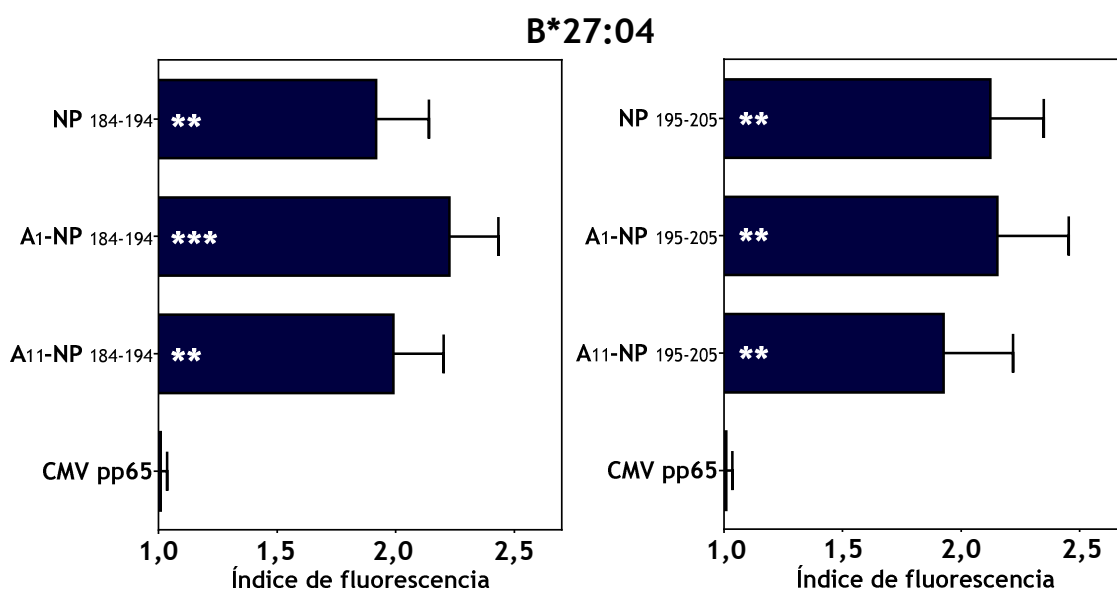


Figura 26. Estabilización de HLA-B*27:04 con análogos monosustituidos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:04 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

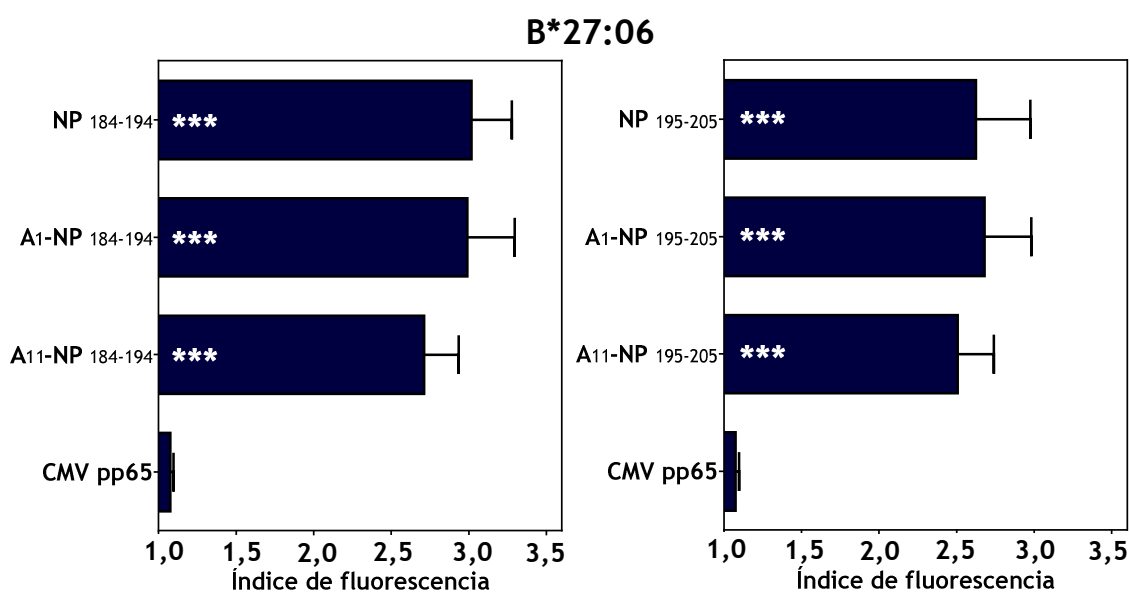


Figura 27. Estabilización de HLA-B*27:06 con análogos monosustituidos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:06 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

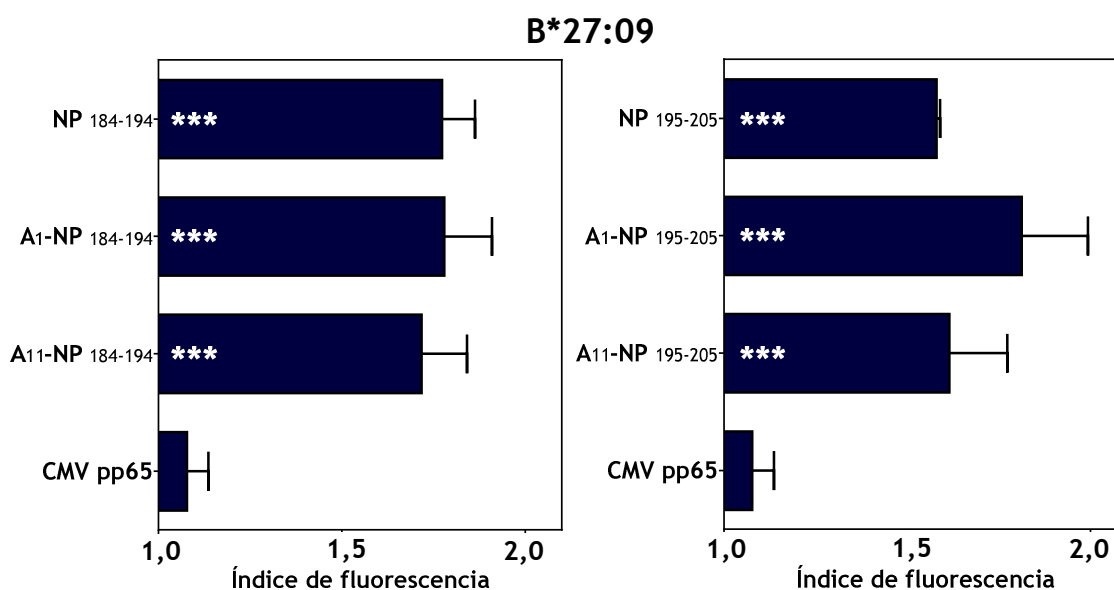


Figura 28. Estabilización de HLA-B*27:09 con análogos monosustituidos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células T2 transfectadas con HLA-B*27:09 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

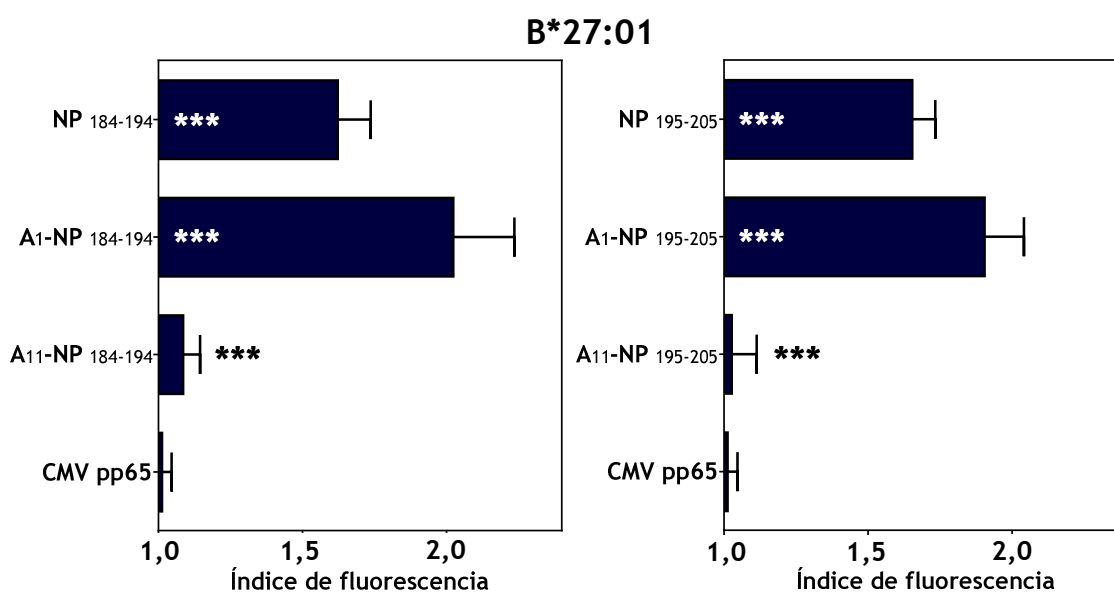


Figura 29. Estabilización de HLA-B*27:01 con análogos monosustituidos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:01 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

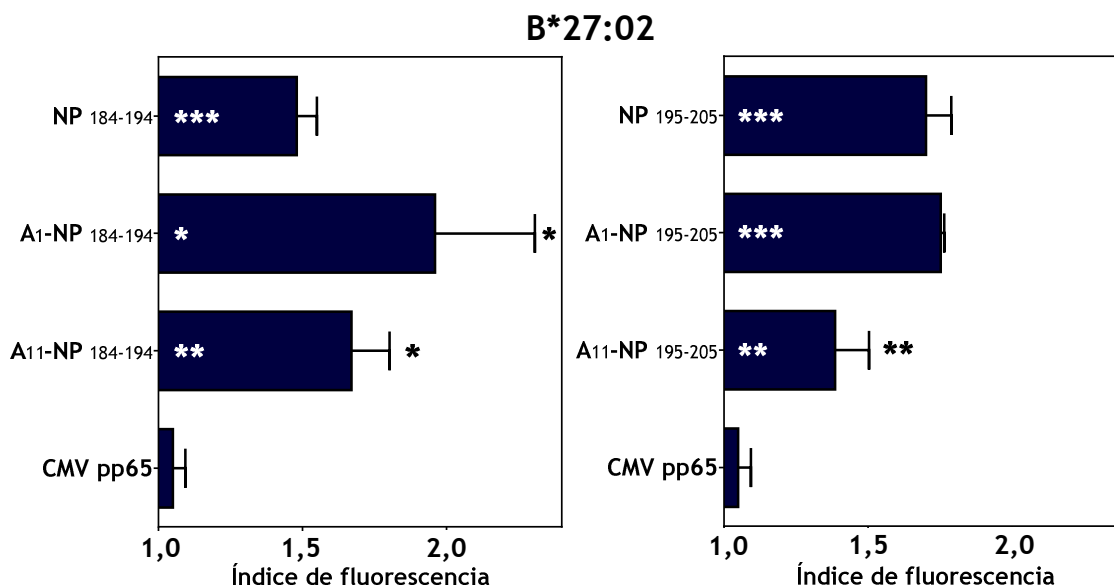


Figura 30. Estabilización de HLA-B*27:02 con análogos monosustituidos de Ala de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:02 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados en todos los paneles se representan tal y como se describe en la Figura 24, mostrando los valores de las medias obtenidos a partir de tres a cinco experimentos independientes.

Tabla 6. Ensayos de estabilización de HLA con análogos monosustituidos de alanina de los ligandos sintéticos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ y NP₁₉₅₋₂₀₅.

Péptido	Secuencia	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
NP ₁₈₄₋₁₉₄	RRANNVLKNEM	1,9 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
A1-NP ₁₈₄₋₁₉₄	ARANNVLKNEM	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	3,0 ± 0,3	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,3
A11-NP ₁₈₄₋₁₉₄	RRANNVLKNEA	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1
NP ₁₉₅₋₂₀₅	KRYKGLLPKDI	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
A1-NP ₁₉₅₋₂₀₅	ARYKGLLPKDI	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1
A11-NP ₁₉₅₋₂₀₅	KRYKGLLPKDA	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,3	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1

^a Los datos se muestran como el índice de fluorescencia cuando los péptidos se utilizaron a 200µM ± D.E. Los resultados representan las medias de tres a cinco experimentos independientes. Los valores en negrita representan valores p significativos ($p < 0,01$) frente a los ligandos de HRSV NP₁₈₄₋₁₉₄ o NP₁₉₅₋₂₀₅, dependiendo de cada péptido monosustituido. También se destacan en caracteres rojos aquellos que suponen un descenso significativo en la EC₅₀ respecto al péptido original. Asimismo, también se encuentran subrayados aquellos valores en los que no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) frente al control negativo CMV pp65.

2.11 Varios ligandos procedentes de diferentes virus validan el motivo de unión mínimo Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Leu/Met.

Para comprobar la predicción del motivo de anclaje mínimo anteriormente propuesto, se seleccionaron tres nuevos péptidos sintéticos procedentes de virus distintos de HRSV: HIV gp160₅₀₀₋₅₀₈ [195], MV F₄₃₈₋₄₄₆ [196] y Flu PB1₂₃₈₋₂₄₆ [197]. Estos péptidos presentaban el motivo mínimo identificado para el correcto anclaje a los diversos subtipos de HLA-B*27, es decir, residuos básicos en P1 y un residuo voluminoso hidrofóbico en PΩ (Tabla 7). Como se había predicho, los ensayos de estabilización de complejos péptido-MHC mostraron que los péptidos virales sintéticos presentaban perfiles de unión similares a los obtenidos con ligandos de alta afinidad para todos los subtipos analizados, a saber, B*27:05 (Figura 31), B*27:03 (Figura 32), B*27:04 (Figura 33), B*27:06 (Figura 34), B*27:09 (Figura 35), B*27:01 (Figura 36) y B*27:02 (Figura 37). En la Tabla 7 se muestra un resumen de los valores de afinidad obtenidos.

Finalmente, para descartar cualquier contribución en la unión a la molécula HLA por motivos de anclaje auxiliares independientes de las posiciones P1 y PΩ descritas, se diseñó un péptido sintético compuesto únicamente por residuos de alanina, salvo por los motivos de anclaje mínimos comunes identificados (Arg en P1 y P2, y voluminoso hidrofóbico en PΩ, RRA₇I). Dicho péptido también mostró una unión eficiente a los siete subtipos de B*27 analizados (Figuras 31-37 y Tabla 7).

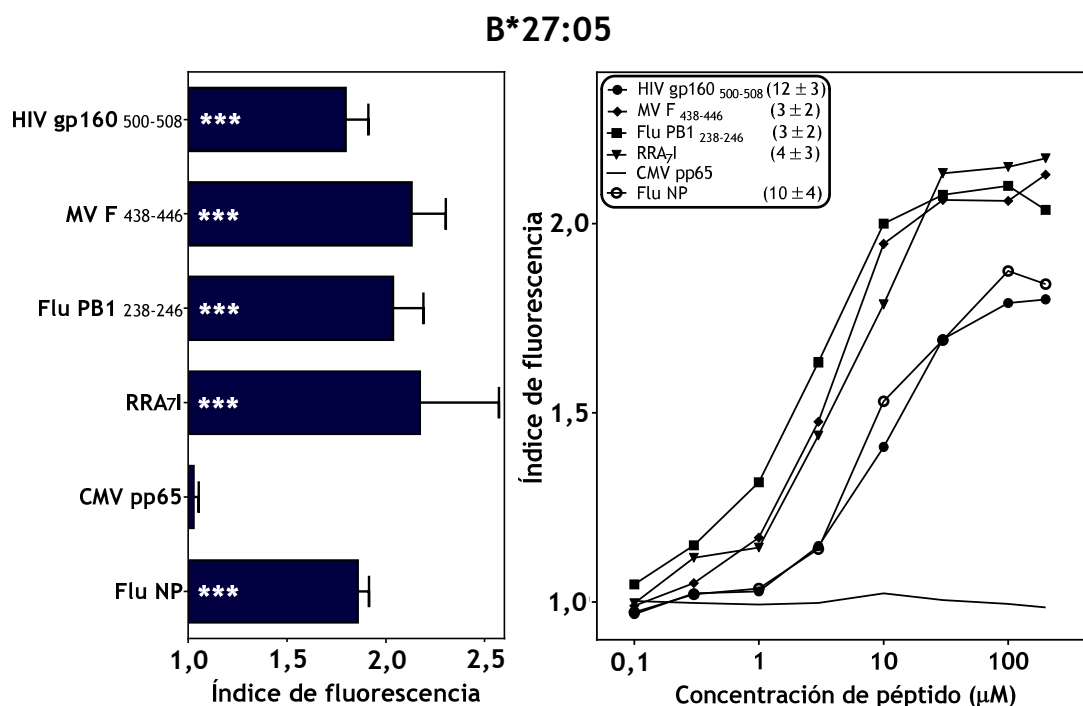


Figura 31. Estabilización de HLA-B*27:05 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:05 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

B*27:03

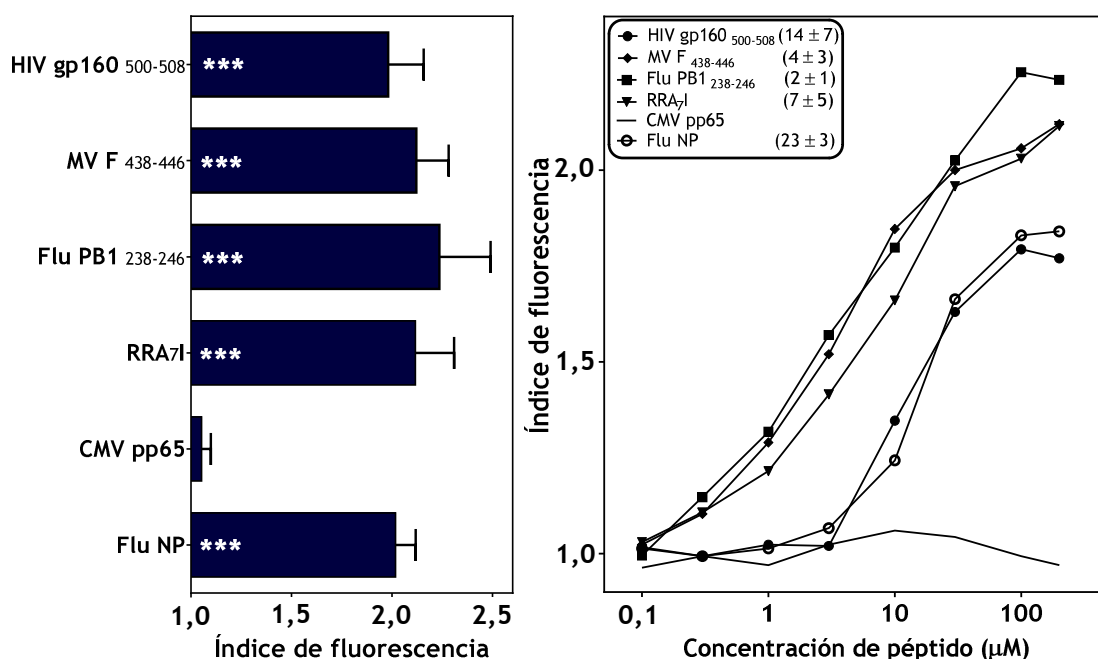


Figura 32. Estabilización de HLA-B*27:03 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:03 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

B*27:04

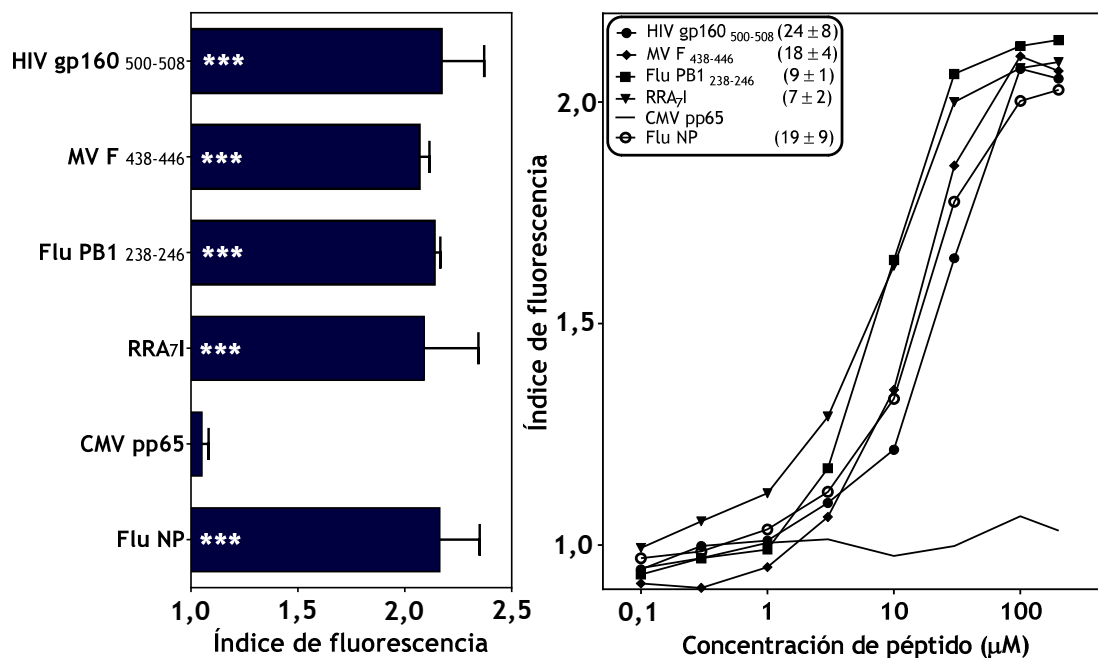


Figura 33. Estabilización de HLA-B*27:04 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:04 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

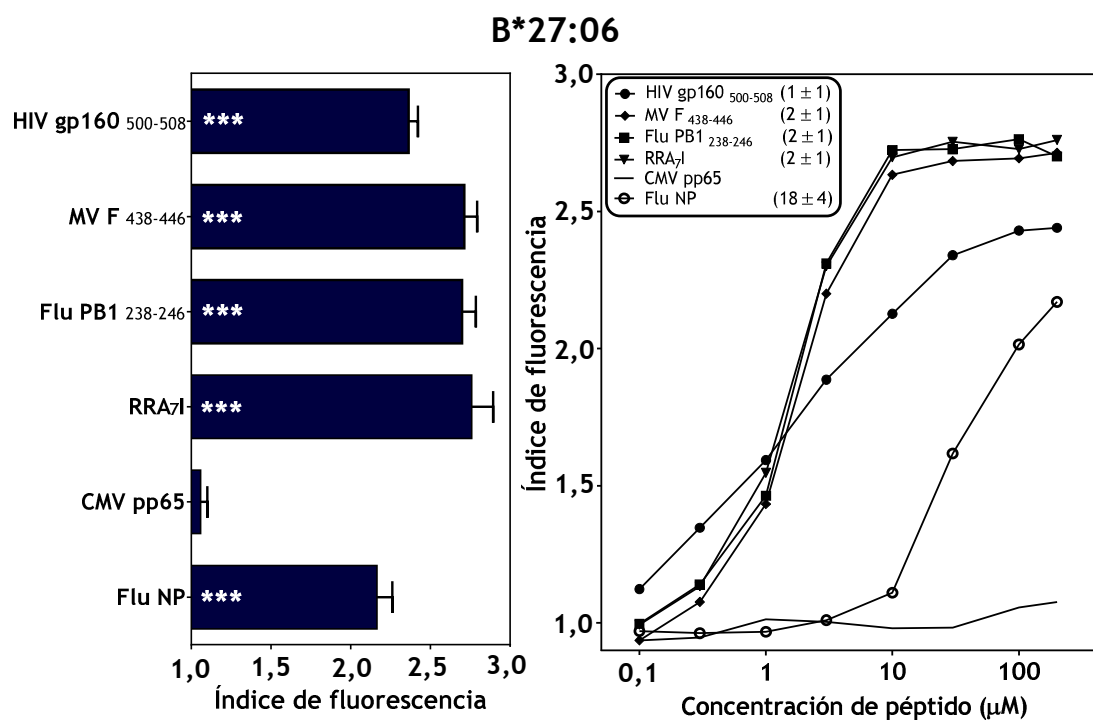


Figura 34. Estabilización de HLA-B*27:06 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:06 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

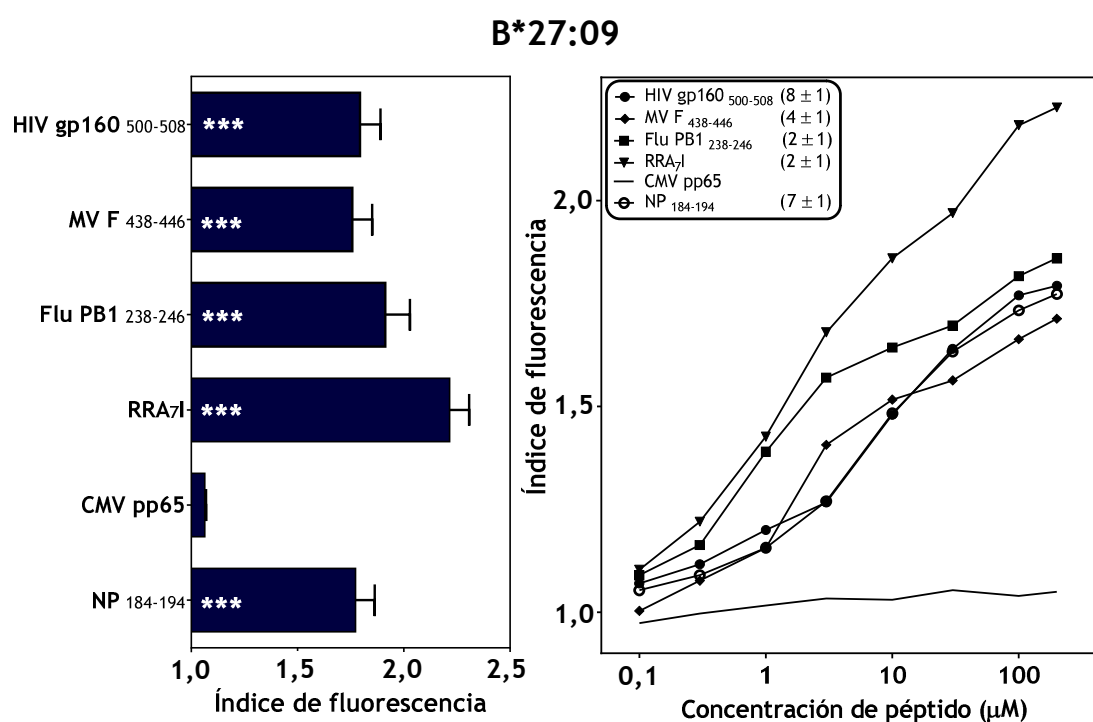


Figura 35. Estabilización de HLA-B*27:09 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células T2 transfectadas con HLA-B*27:09 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

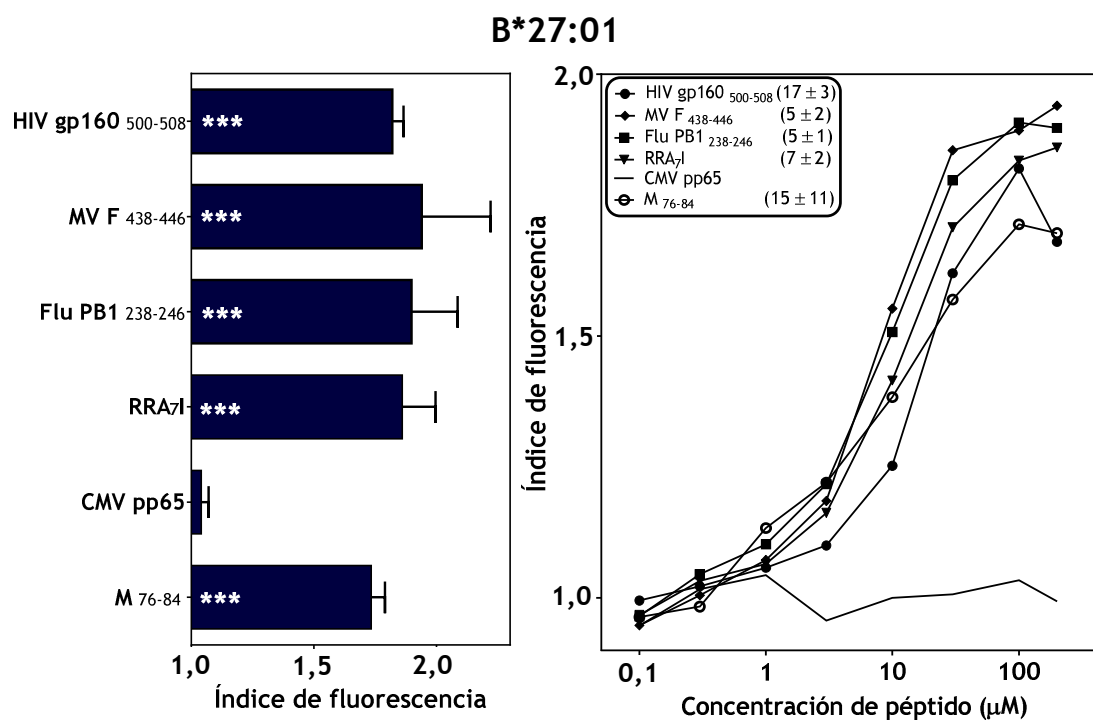


Figura 36. Estabilización de HLA-B*27:01 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:01 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

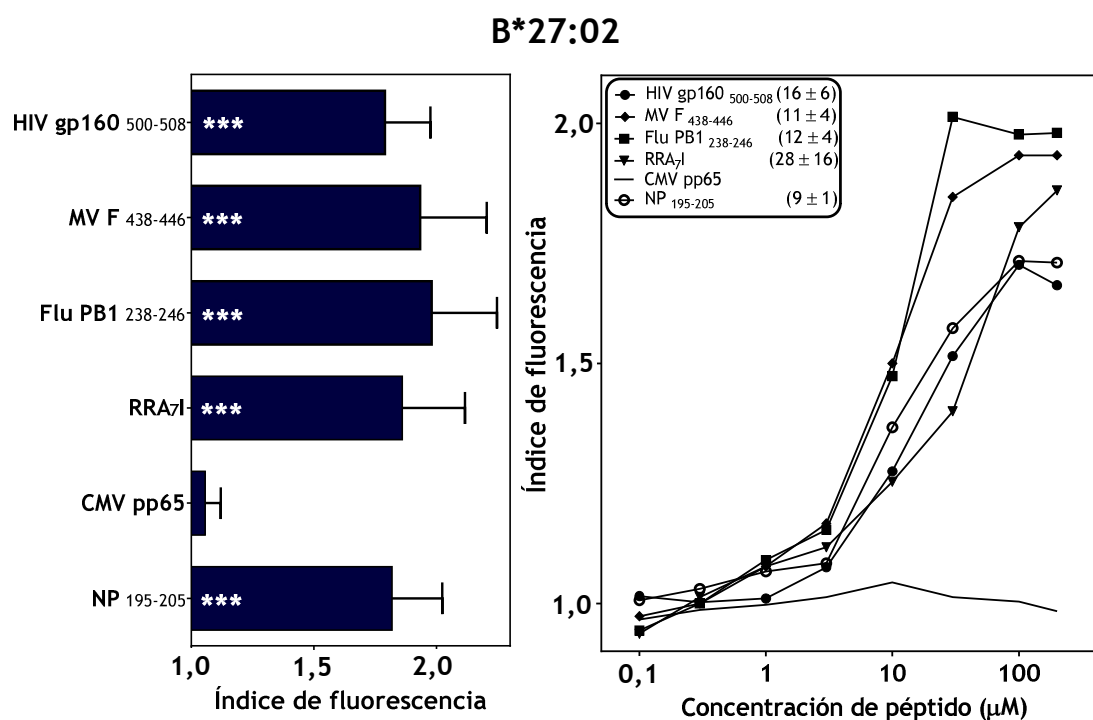


Figura 37. Estabilización de HLA-B*27:02 con péptidos sintéticos portadores de los motivos de anclaje mínimos. La estabilidad de los complejos péptido-HLA en la superficie de las células RMA-S transfectadas con HLA-B*27:02 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 17 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

Tabla 7. Valores de afinidad para los ligandos de HIV, virus del sarampión y virus de la gripe en los diferentes subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Secuencia	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
HIV gp160 ₅₀₀₋₅₀₈	KRAVGIGAL	12 ± 3 ^a	14 ± 7	24 ± 8	1 ± 1	8 ± 1	17 ± 3	16 ± 6
MV F ₄₃₈₋₄₄₆	RRYPDAVYL	3 ± 2	4 ± 3	18 ± 4	2 ± 1	4 ± 1	5 ± 2	11 ± 4
Flu PB1 ₂₃₈₋₂₄₆	RRAIATPGM	3 ± 2	2 ± 1	9 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	5 ± 1	12 ± 4
RRA ₇ l	RRAAAAAAAI	4 ± 3	7 ± 5	7 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	7 ± 2	28 ± 16

^a Los datos se muestran como la EC₅₀ (μM) ± D.E. y son la media de tres a cinco experimentos diferentes.

2.12 El patrón de estabilización de los péptidos unidos a las diferentes moléculas HLA-B*27 ofrece una relación funcional entre los diferentes alelos.

En resumen, respecto a la afinidad de unión mostrada por los nueve ligandos de HRSV en HLA-B*27:05, siete péptidos vieron su afinidad reducida en B*27:01 y B*27:02, seis en B*27:03, cinco en B*27:04, cuatro en B*27:06 y sólo tres en B*27:09 (Tablas 8 y 9). Estos datos no se relacionan con las diferencias en aminoácidos entre los diferentes subtipos o con las interacciones individuales con las respectivas subcavidades del sitio de unión al antígeno, lo cual indica probables efectos compensatorios de las sustituciones en algunos residuos. Dichos efectos resultan particularmente evidentes en el subtipo B*27:06, donde ciertos ligandos de HRSV con residuos apolares en PQ mostraron un incremento en la afinidad respecto a B*27:05. Finalmente, en base a los patrones de afinidad observados en los subtipos de HLA-B*27, la relación funcional entre B*27:05 y el resto de alelos se puede establecer como B*27:05 > B*27:09 > B*27:06 > B*27:04 > B*27:03 > B*27:01 = B*27:02.

Tabla 8. Resumen de los ensayos de afinidad para los diferentes subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Secuencia	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
L ₂₀₈₉₋₂₀₉₇	GRNEVFSNK	+++ ^a	++	++	+	++	-	+
M ₇₆₋₈₄	SRSALLAQM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
M ₁₆₉₋₁₇₇	VRNKDLNTL	++	+	+++	++++	++++	+	++
M2 ₁₅₀₋₁₅₉	KRLPADVLKK	++++	++	++	+	+++	-	++
NP ₁₀₀₋₁₀₉	HRQDINGKEM	+++	++	++	++++	+++	+	++
NP ₁₈₄₋₁₉₄	RRANNVLKNEM	++++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
NP ₁₉₅₋₂₀₅	KRYKGLLPKDI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
NS2 ₃₇₋₄₅	HRFIYLIH	++++	++++	++	+++	+++	-	++
P ₁₉₈₋₂₀₈	LRNEESEKMAK	++	+	-	+	++	-	-
HIV gp160 ₅₀₀₋₅₀₈	KRAVGIGAL	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
MV F ₄₃₈₋₄₄₆	RRYPDAVYL	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Flu PB1 ₂₃₈₋₂₄₆	RRAIATPGM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
RRA ₇ l	RRAAAAAAAI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++

^a Los símbolos +, ++, +++ y ++++ indican valores de EC₅₀ >200 μM, 200-61 μM, 60-20 μM y <20μM, respectivamente. Un guion (-) indica ausencia de diferencia estadística en el índice de fluorescencia respecto al control negativo. Todos los valores positivos de EC₅₀ muestran diferencias significativas (p < 0,05) respecto al control negativo.

Tabla 9. Comparación de la afinidad entre los diferentes subtipos de HLA-B*27 respecto a HLA-B*27:05.

Péptido	Secuencia	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
L ₂₀₈₉₋₂₀₉₇	GRNEVFSNK	▼ ^a	▼	▼	▼	▼	▼
M ₇₆₋₈₄	SRSALLAQM	—	—	—	—	—	▼
M ₁₆₉₋₁₇₇	VRNKDLNTL	▼	▲	▲	▲	▼	—
M2 ₁₅₀₋₁₅₉	KRLPADVLKK	▼	▼	▼	▼	▼	▼
NP ₁₀₀₋₁₀₉	HRQDINGKEM	▼	▼	▲	—	▼	▼
NP ₁₈₄₋₁₉₄	RRANNVLKNEM	▼	—	—	—	▼	▼
NP ₁₉₅₋₂₀₅	KRYKGLLPKDI	—	—	—	—	—	—
NS2 ₃₇₋₄₅	HRFIYLIH	—	▼	▼	▼	▼	▼
P ₁₉₈₋₂₀₈	LRNEESEKMAK	▼	▼	▼	—	▼	▼
HIV gp160 ₅₀₀₋₅₀₈	KRAVGIGAL	—	▼	—	—	—	—
MV F ₄₃₈₋₄₄₆	RRYPDAVYL	—	—	—	—	—	—
Flu PB1 ₂₃₈₋₂₄₆	RRAIATPGM	—	—	—	—	—	—
RRA ₇ l	RRAAAAAAAI	—	—	—	—	—	▼

^a Un triángulo rojo orientado hacia abajo (▼) o verde orientado hacia arriba (▲) indican, respectivamente, menor o mayor afinidad del péptido respecto al subtipo HLA-B*27:05. Un guion (—) indica que no existen cambios en la afinidad entre B*27:05 y el subtipo indicado.

3 LOS GRUPOS TRANSCRIPCIONALES DE HRSV DETERMINAN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA ANTIVIRAL MEDIADA POR HLA DE CLASE I

3.1 Las moléculas HLA de clase I presentan una amplia variedad de ligandos procedentes de diversas proteínas de HRSV.

Varios estudios previos han permitido, mediante espectrometría de masas, la identificación de diversos ligandos virales provenientes del procesamiento y presentación de antígenos en líneas celulares infectadas con HRSV. Así, utilizando la misma aproximación experimental se han encontrado un total de dieciséis ligandos que estaban asociados a diferentes moléculas HLA de clase I, a saber, tres (F₂₂₉₋₂₃₉, N₃₁₅₋₃₂₃ y NS1₃₃₋₄₁) para HLA-A*02:01, dos (N₃₀₆₋₃₁₄ y NS2₁₉₋₃₀) para HLA-B*07:02, uno (G₂₅₋₃₃) para HLA-C*07:02, uno (M₁₈₈₋₁₉₈) para HLA-C*04:01 [198] y los nueve de HLA-B*27:05 ya mencionados en la presente memoria (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇, M₇₆₋₈₄, M₁₆₉₋₁₇₇, M2₁₅₀₋₁₅₉, NP₁₀₀₋₁₀₉, NP₁₈₄₋₁₉₄, NP₁₉₅₋₂₀₅, NS2₃₇₋₄₅ y P₁₉₈₋₂₀₈) [194]. En la Tabla 10 se muestra un resumen de estos ligandos provenientes de nueve de las once proteínas virales codificadas por el genoma de HRSV.

Tabla 10. Resumen de los ligandos de HRSV identificados por análisis de espectrometría de masas en células infectadas.

Proteína	Posición	Secuencia ^a	HLA de clase I	Referencia
Proteína de fusión	229-239	RLLEITREFSV	HLA-A*02:01	Esta tesis
Nucleoproteína	315-323	TQFPHFSSV	HLA-A*02:01	Esta tesis
Proteína no estructural 1	33-41	KLIHLTNAL	HLA-A*02:01	Esta tesis
Nucleoproteína	306-314	NPKASLLSL	HLA-B*07:02	Esta tesis
Proteína no estructural 2	19-30	RPLSLETTITSL	HLA-B*07:02	Esta tesis
Polimerasa	2089-2097	GRNEVFSNK	HLA-B*27:05	[194]
Matriz	76-84	SRSALLAQM	HLA-B*27:05	[194]
Matriz	169-177	VRNKDLNTL	HLA-B*27:05	[194]
Matriz 2-1	150-159	KRLPADVLKK	HLA-B*27:05	[194]
Nucleoproteína	100-109	HRQDINGKEM	HLA-B*27:05	[194]
Nucleoproteína	184-194	RRANNVLKNEM	HLA-B*27:05	[194]
Nucleoproteína	195-205	KRYKGLLPKDI	HLA-B*27:05	[194]
Proteína no estructural 2	37-45	HRFIYLINH	HLA-B*27:05	[194]
Fosfoproteína	198-208	LRNEESEKMAK	HLA-B*27:05	[194]
Matriz	188-198	AITNAKII	HLA-C*04:01	[198]
Glicoproteína	25-33	FISSGLYKL	HLA-C*07:02	Esta tesis

^a Todas las secuencias derivan de la cepa Long de HRSV.

3.2 Los péptidos F₂₂₉₋₂₃₉, N₃₁₅₋₃₂₃ y NS1₃₃₋₄₁ de HRSV detectados por espectrometría de masas son ligandos de alta afinidad para HLA-A*02:01.

En primer lugar, para confirmar que HLA-A*02:01 era la molécula presentadora de los ligandos virales F₂₂₉₋₂₃₉, N₃₁₅₋₃₂₃ y NS1₃₃₋₄₁ se llevaron a cabo ensayos de estabilidad en transfectantes de la línea celular deficiente en TAP RMA-S que expresaban HLA-A*02:01. Los resultados indicaron que los tres ligandos se unían a HLA-A*02:01 mostrando valores de EC₅₀ situados en el rango de los que se observan generalmente entre los ligandos de alta afinidad (Figura 38).

Los motivos de anclaje de la molécula HLA-A*02:01, a diferencia de HLA-B*27, son relativamente laxos pues permiten acomodar una amplia gama de aminoácidos hidrofóbicos en P2 y PΩ (base de datos SYFPEITHI [199] y [200]). Por ello, los ligandos F₂₂₉₋₂₃₉ y NS1₃₃₋₄₁ se pueden considerar ligandos canónicos para HLA-A*02:01, ya que poseen residuos de Leu en P2. Sin embargo, el ligando N₃₁₅₋₃₂₃ posee Gln en el motivo de anclaje principal en P2 por lo que se le puede calificar como un ligando inusual de la molécula HLA-A*02:01.

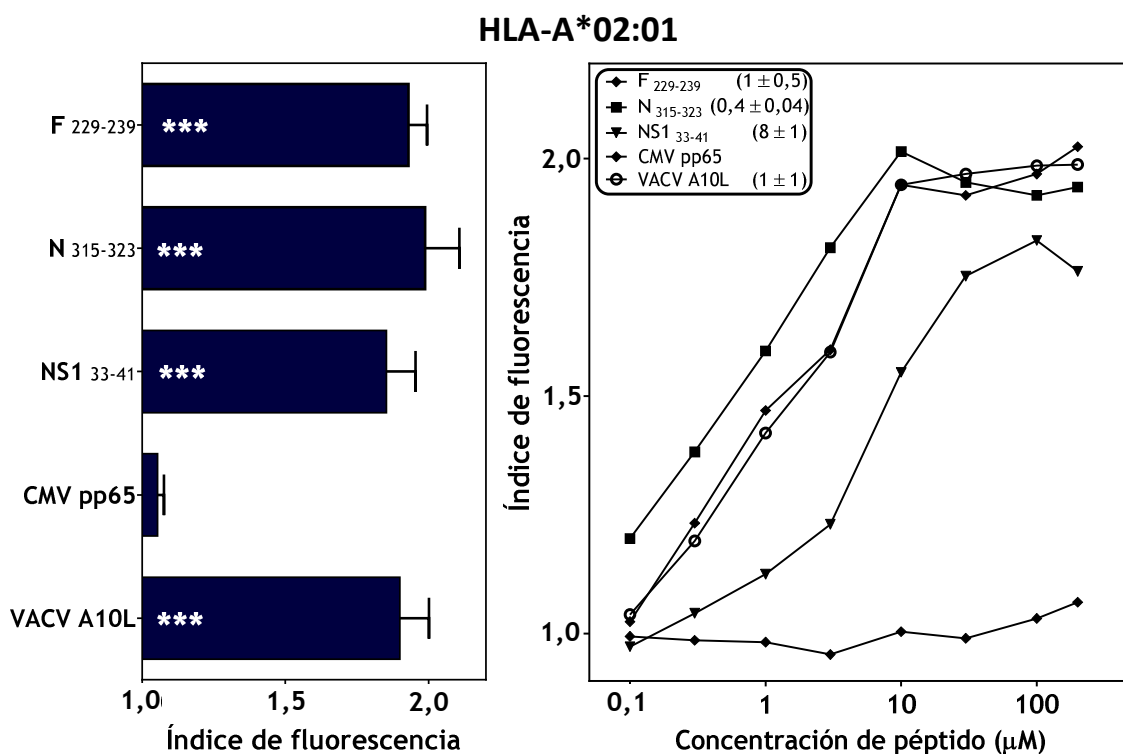


Figura 38. Estabilización de HLA-A*02:01 con ligandos sintéticos de HRSV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-A*02:01 en la superficie celular de las células RMA-S transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

3.3 Los péptidos virales N₃₀₆₋₃₁₄ y NS2₁₉₋₃₀ se unen con alta afinidad a la molécula HLA-B*07:02.

A continuación, para confirmar también que los ligandos N₃₀₆₋₃₁₄ y NS2₁₉₋₃₀ se unen a la molécula HLA-B*07:02, se llevaron a cabo ensayos de estabilización con células T2 deficientes en TAP transfectadas con esta molécula HLA de clase I. El perfil de unión de ambos péptidos, así como sus valores de EC_{50} , resultaron equivalentes a los encontrados en otros ligandos de alta afinidad presentados de forma natural por la molécula HLA-B*07:02 (Figura 39). Puesto que el motivo de anclaje para HLA-B*07:02 consiste en Pro en posición 2 y Leu en posición C-terminal ([201] y base de datos SYFPEITHI [199]), la afinidad de tanto N₃₀₆₋₃₁₄ como NS2₁₉₋₃₀ por HLA-B*07:02 los confirma como ligandos canónicos de esta molécula de HLA de clase I.

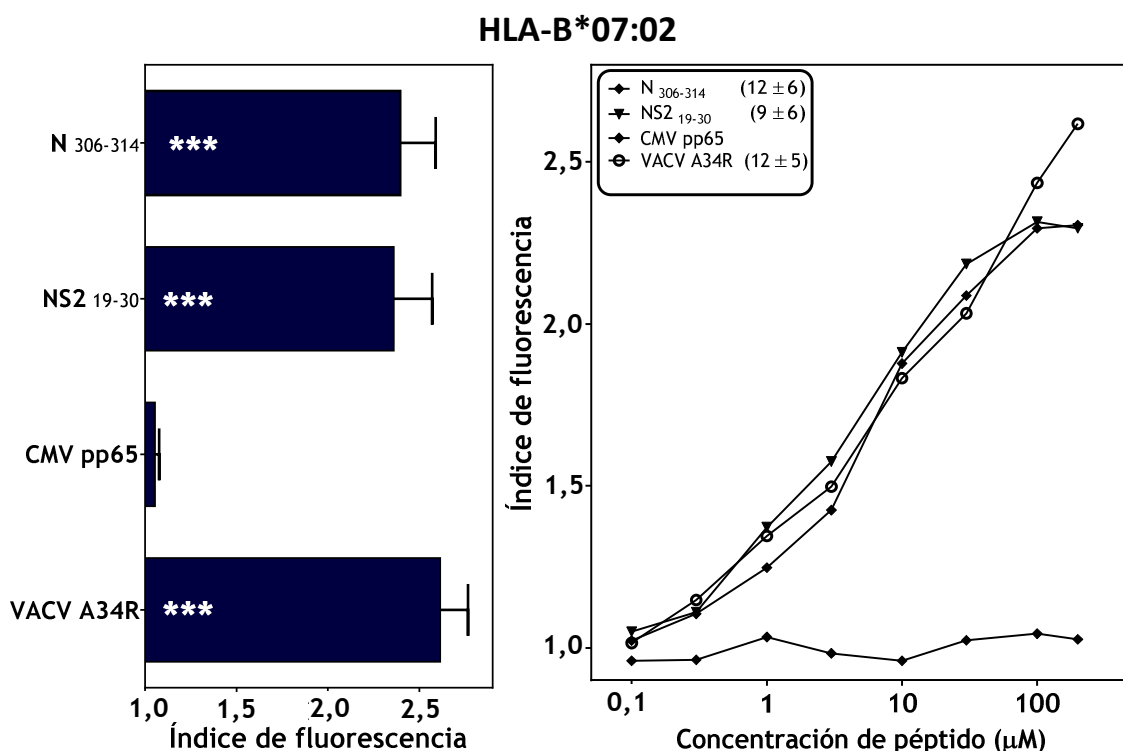


Figura 39. Estabilización de HLA-B*07:02 con ligandos sintéticos de HRSV. Se realizaron medidas mediante citometría de flujo de la estabilidad de los complejos HLA-B*07:02 en la superficie celular de las células T2 transfectadas. Los resultados se representan tal y como se describe en la Figura 10 y muestran los valores de las medias obtenidos de tres o cuatro experimentos independientes.

3.4 El contenido en aminoácidos implicados en los motivos de anclaje no influye en el número de ligandos de HLA de clase I derivados de las proteínas virales.

Dos de las cinco moléculas HLA de clase I implicadas en la presentación de los ligandos de HRSV, HLA-B*07:02 y HLA-B*27:05, poseen motivos de anclaje muy restrictivos ya que la presencia de prolina o arginina en P2 es muy mayoritaria en los ligandos de HLA-B*07:02 y HLA-B*27:05, respectivamente (base de datos SYFPEITHI [199]). Para analizar si la abundancia de estos aminoácidos en el proteoma viral se relacionaba con la cantidad de ligandos de HLA de clase I detectados por espectrometría de masas en los ensayos previos, se realizó un análisis de la distribución del contenido en prolina y arginina de todas las proteínas de HRSV y se comparó con el número de ligandos identificados para cada proteína (Tabla 11). Los datos indican que no existe correlación alguna entre la abundancia de prolina y arginina presente en las diferentes proteínas virales con el número de ligandos de HLA-B*07:02 y HLA-B*27:05 que se generan a partir de ellas.

Tabla 11. Distribución del contenido en prolina y arginina y de los ligandos de HLA-B*07:02 y -B*27:05 en el proteoma de HRSV.

Proteína de HRSV ^a	Nº de Pro	Nº de Arg	Nº de Pro + Arg	% de Pro + Arg	Nº de ligandos ^b
L	68	80	148	45,5	1
F	15	18	33	10,2	0
G	26	4	30	9,2	0
N	9	16	25	7,7	4
P	12	11	23	7,1	1
M	12	6	18	5,5	2
M2	6	11	17	5,2	1
NS2	7	6	13	4,0	2
M2-2	5	3	8	2,5	0
NS1	5	1	6	1,8	0
SH	2	2	4	1,2	0

^a Todas las secuencias provienen de la cepa Long de HRSV. Las abreviaturas utilizadas son: L (polimerasa), F (proteína de fusión), G (glicoproteína), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de la matriz), M2-1 (proteína de la matriz 2-1), NS2 (proteína no estructural 2), M2-2 (proteína de la matriz 2-2), NS1 (proteína no estructural 1), SH (proteína pequeña hidrofóbica).

^b Número de ligandos virales de HLA-B*07:02 y -B*27:05 detectados por espectrometría de masas.

3.5 El tamaño de las proteínas virales no influye en la cantidad de ligandos de HLA de clase I derivados de ellas.

Otra posibilidad consistía en que las proteínas grandes de HRSV podrían ser la fuente de un mayor número de ligandos. Por ello, se realizó una comparación entre el número de residuos de cada proteína y el número de ligandos de HLA de clase I identificados que derivan de ellas (Figura 40). Los resultados muestran que no existe correlación alguna entre el tamaño de las proteínas virales y la cantidad de ligandos que proceden de ellas.

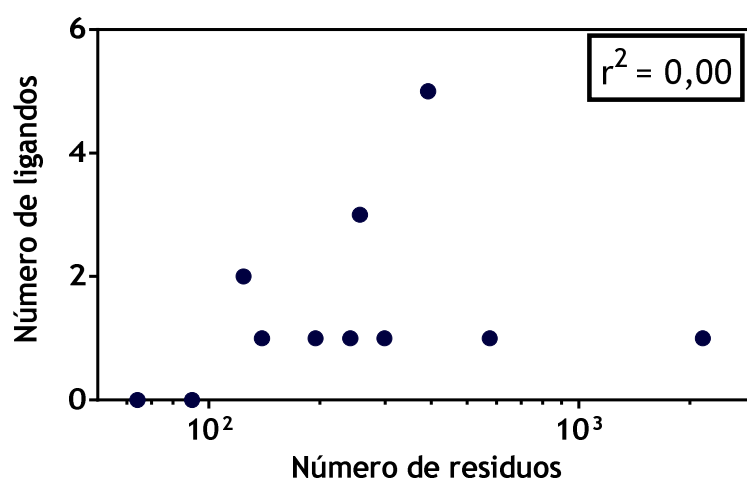


Figura 40. Comparación entre el tamaño de las proteínas de HRSV y el número de ligandos de HLA de clase I identificados. El tamaño de las proteínas virales se representa como número de residuos para cada una de las proteínas individuales. El coeficiente de determinación se muestra en el recuadro superior derecho.

3.6 Los grupos transcripcionales de HRSV determinan la distribución de los ligandos por el proteoma viral.

Tal y como se ha indicado en la introducción de la presente memoria de tesis, en la transcripción del genoma de HRSV la síntesis de mRNA disminuye a medida que aumenta la distancia de cada gen al extremo 3' del genoma (Figura 8). Como consecuencia, los genes próximos al promotor 3' se expresan más eficientemente que los más distales [106] por lo que, al igual que el resto de virus que pertenecen al orden Mononegavirales, el genoma de HRSV se ha dividido en tres grupos transcripcionales dependiendo de los niveles de expresión de mRNA [202]: 3' o de alta transcripción, intermedio (IM) y 5' o de baja transcripción. Estos grupos están conformados respectivamente por los conjuntos de genes consistentes en NS1, NS2, N, P y M para el grupo 3', SH, G, F y M2 para el grupo IM y el gen L de la polimerasa de HRSV para el grupo 5'. Estos conjuntos constituyen el 23% (grupo 3'), 29% (grupo intermedio) y 48% (grupo 5'), respectivamente, del proteoma viral, medido como número de aminoácidos para cada proteína (Figura 41).

Al analizar la distribución a lo largo del proteoma viral de los dieciséis ligandos virales obtenidos por espectrometría de masas en las células infectadas con HRSV, se observó una mayor abundancia de ligandos procedentes de las proteínas codificadas por genes del grupo 3' (Figura 41). Así, el 75% de los péptidos detectados se incluían en proteínas codificadas por genes del grupo transcripcional 3', mientras que solo tres (un 19%) y uno (un 6%) de ellos provenían de proteínas codificadas por genes de los grupos IM y 5', respectivamente.

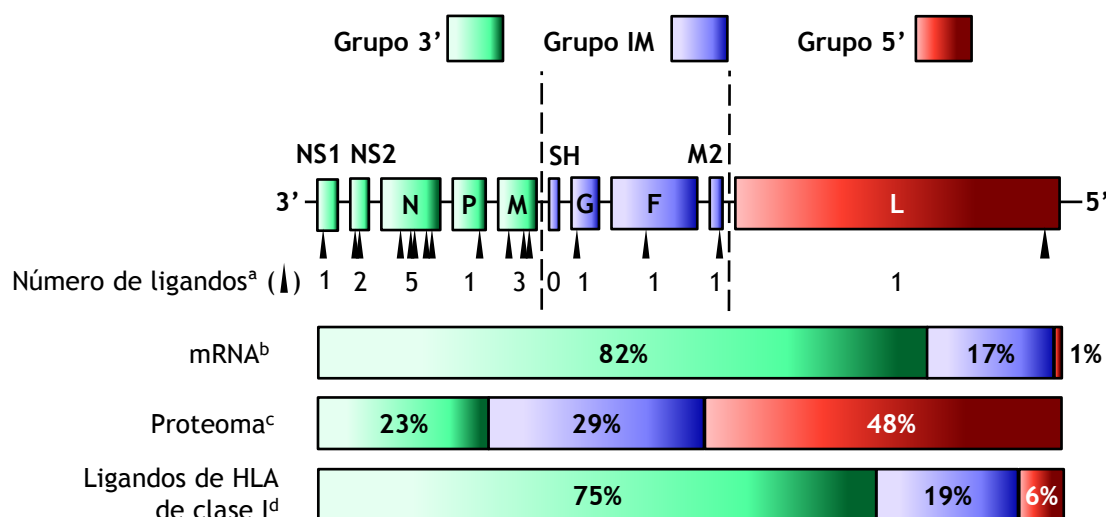


Figura 41. Relación de los ligandos virales restringidos por HLA de clase I con el genoma, transcriptoma y proteoma de HRSV. Representación esquemática del genoma de HRSV indicando los tres grupos transcripcionales que codifican para el proteoma viral (3' de color verde, intermedio o IM de color azul y 5' de color rojo) separados por líneas discontinuas. Las abreviaturas utilizadas para los genes virales son las indicadas en la Figura 8. En ^a se representa con un triángulo debajo de cada gen la posición de los ligandos de HLA de clase I aislados en células infectadas con HRSV. Asimismo, para cada gen se indica el número total de ligandos detectados. También se representan en ^b el gradiente transcripcional de HRSV como la ratio molar, expresada como porcentaje, entre los mRNAs de los diferentes grupos transcripcionales [106,203,204], en ^c el porcentaje del proteoma correspondiente a cada grupo transcripcional en función del número de residuos de cada proteína y en ^d el porcentaje de ligandos virales de HLA de clase I detectados en cada grupo transcripcional.

Los análisis estadísticos mostraron que la distribución 12:3:1 obtenida de los ligandos de HLA de clase I hallados por espectrometría de masas es diferente (valor $p < 0,001$) de la distribución 4:4:8 que cabría esperar si los péptidos se repartieran aleatoriamente en función del tamaño del proteoma. Asimismo, no se encontró diferencia estadística respecto a la distribución en función de la cantidad de mRNA (Figura 42). En resumen, los ligandos virales no se distribuyen al azar a lo largo del proteoma de HRSV sino que se concentran en las proteínas codificadas por genes del grupo transcripcional 3', los cuales se transcriben con mayor eficiencia.

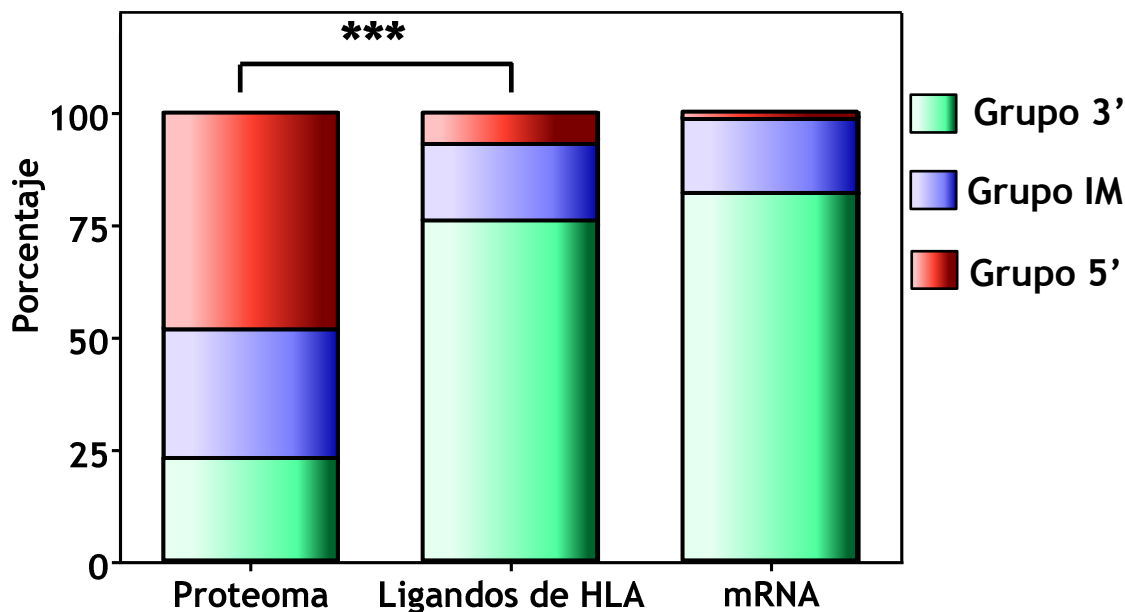


Figura 42. Proporción del transcriptoma, proteoma y ligandoma de HRSV restringido por HLA de clase I relativa a los diferentes grupos transcripcionales. Las cantidades se representan como el porcentaje de residuos de cada proteína para cada grupo transcripcional (columna de proteoma), como el porcentaje de ligandos de HLA de clase I detectados por espectrometría de masas en células infectadas con HRSV (columna de ligandos de HLA) o como porcentajes de la ratio molar de mRNAs para cada grupo transcripcional (columna de mRNA). Cada grupo transcripcional está indicado con el mismo color que en la Figura 41, tal y como se indica en la leyenda. La diferencia estadísticamente significativa se indica como *** (valor $p < 0,001$).

3.7 Los ligandos virales de HLA-A*02:01, B*07:02 y B*27:05 detectados por espectrometría de masas generan respuestas específicas en ratones transgénicos para HLA de clase I.

Posteriormente se realizó un estudio de la respuesta fisiológica *in vivo* de los ligandos de HLA de clase I identificados por espectrometría de masas. Para ello se utilizaron distintas cepas de ratón transgénicas para diferentes moléculas HLA de clase I humanas. En cada caso, se determinó la actividad específica de las células T CD8⁺ mediante ensayos ELISPOT de detección del IFN γ secretado en respuesta a cada uno de los ligandos virales, tal y como se muestra en el ensayo representativo de la Figura 43.

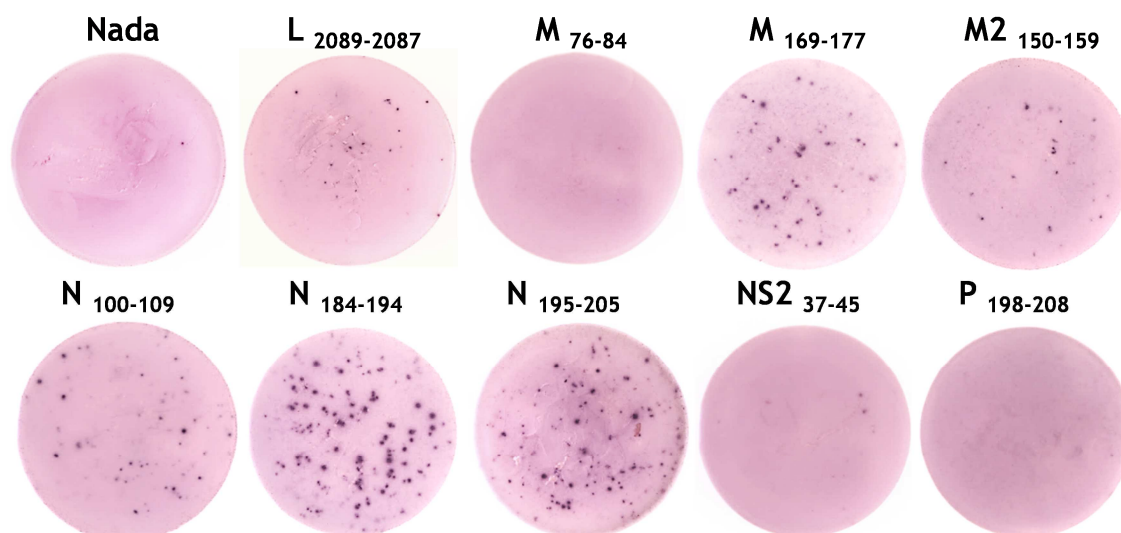


Figura 43. Medida de IFN γ por ELISPOT utilizando péptidos virales sintéticos de HRSV. Los esplenocitos de ratones HLA-B*27:05⁺ infectados con HRSV siete días antes fueron incubados durante toda la noche con los distintos péptidos virales. Cada pocillo se fotografió individualmente y se realizó el conteo de puntos, los cuales indican la actividad de células T secretoras de IFN γ específicas.

En el caso de los ratones transgénicos para HLA-A*02:01, el péptido N₃₁₅₋₃₂₃ fue el epítipo inmunodominante, si bien los ligandos F₂₂₉₋₂₃₉ y NS1₃₃₋₄₁ también generaron una respuesta de IFN γ específica (Figura 44).

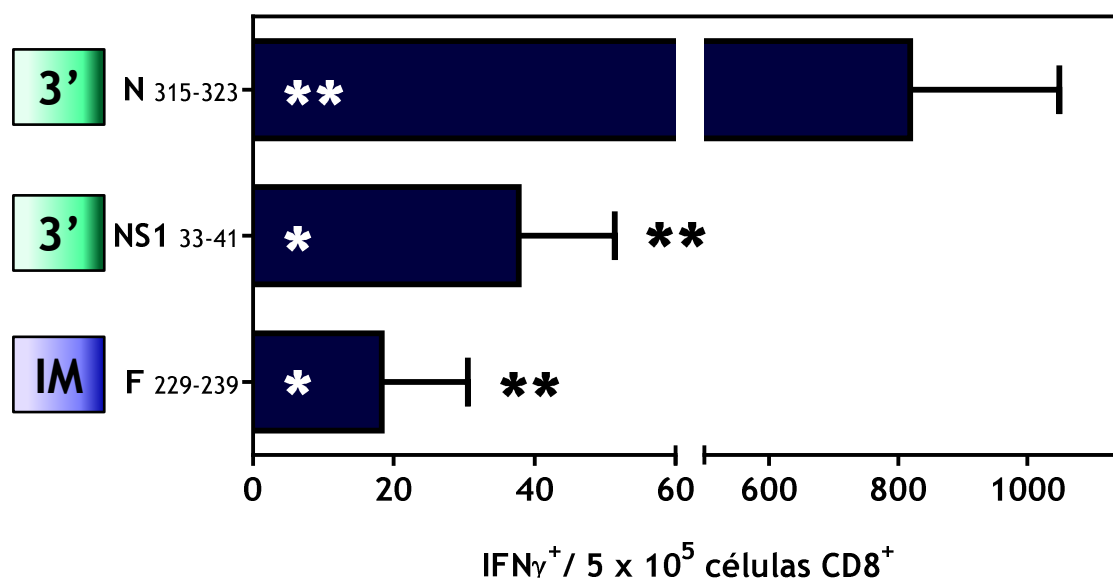


Figura 44. Inmunogenicidad de los ligandos virales de HRSV en ratones transgénicos para HLA-A*02:01. La activación de las células T CD8⁺ se analizó mediante ensayos ELISPOT con células del bazo de ratones HLA-A*02:01⁺, tal y como se indica en la Figura 43. Los resultados se representan como la media \pm E.E.M. de tres a nueve experimentos independientes. Los valores p significativos se representan con * ($p < 0,05$) o ** ($p < 0,01$) en color negro (respecto al control negativo) o blanco (respecto al ligando N₃₁₅₋₃₂₃). En el recuadro al lado izquierdo de cada ligando se muestra el grupo transcripcional al que pertenece el gen que codifica la proteína de la cual proviene el péptido.

En el caso de las respuestas de IFN γ detectadas en los ratones transgénicos para HLA-B*07:02, éstas fueron del mismo orden para los dos péptidos evaluados, NS2₁₉₋₃₀ y N₃₀₆₋₃₁₄ (Figura 45).

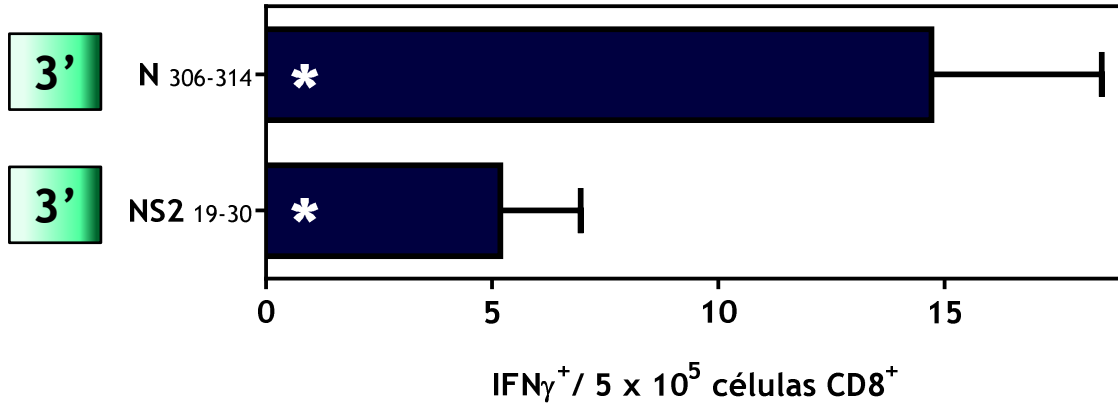


Figura 45. Inmunogenicidad de los ligandos virales de HRSV en ratones transgénicos para HLA-B*07:02. La activación de las células T CD8⁺ se analizó mediante ensayos ELISPOT con células del bazo de ratones HLA-B*07:02⁺, tal y como se indica en la Figura 44. Los resultados representan la media de tres a nueve experimentos independientes.

En cuanto a la inmunogenicidad de los ligandos de HLA-B*27:05, se detectó respuesta mediada por IFN γ en seis de los nueve péptidos estudiados: L₂₀₈₉₋₂₀₉₇, M₁₆₉₋₁₇₇, M2₁₅₀₋₁₅₉, N₁₀₀₋₁₀₉, N₁₈₄₋₁₉₄ y N₁₉₅₋₂₀₅. Dichas respuestas fueron de aproximadamente la misma magnitud para todos ellos, si bien se encontró diferencia estadística entre el epítipo que generaba mayor respuesta (NP₁₈₄₋₁₉₄) y el que provocaba menor secreción de IFN γ (L₂₀₈₉₋₂₀₉₇) (Figura 46). Sin embargo, no se detectó reconocimiento específico de tres de los ligandos previamente descritos: M₇₆₋₈₄, NS₃₇₋₄₅ y P₁₉₈₋₂₀₈. La ausencia de respuesta por parte de las células T para estos tres ligandos en el presente modelo de ratones transgénicos para HLA-B*27:05⁺ podría explicarse por las divergencias respecto a seres humanos en elementos específicos de la respuesta inmunológica mediada por HLA de clase I, como pueden ser la ausencia de la aminopeptidasa ERAP2 [205] o diferencias entre la maquinaria de procesamiento antigénico entre humanos y ratones (tapasina y proteasomas, por ejemplo) [206].

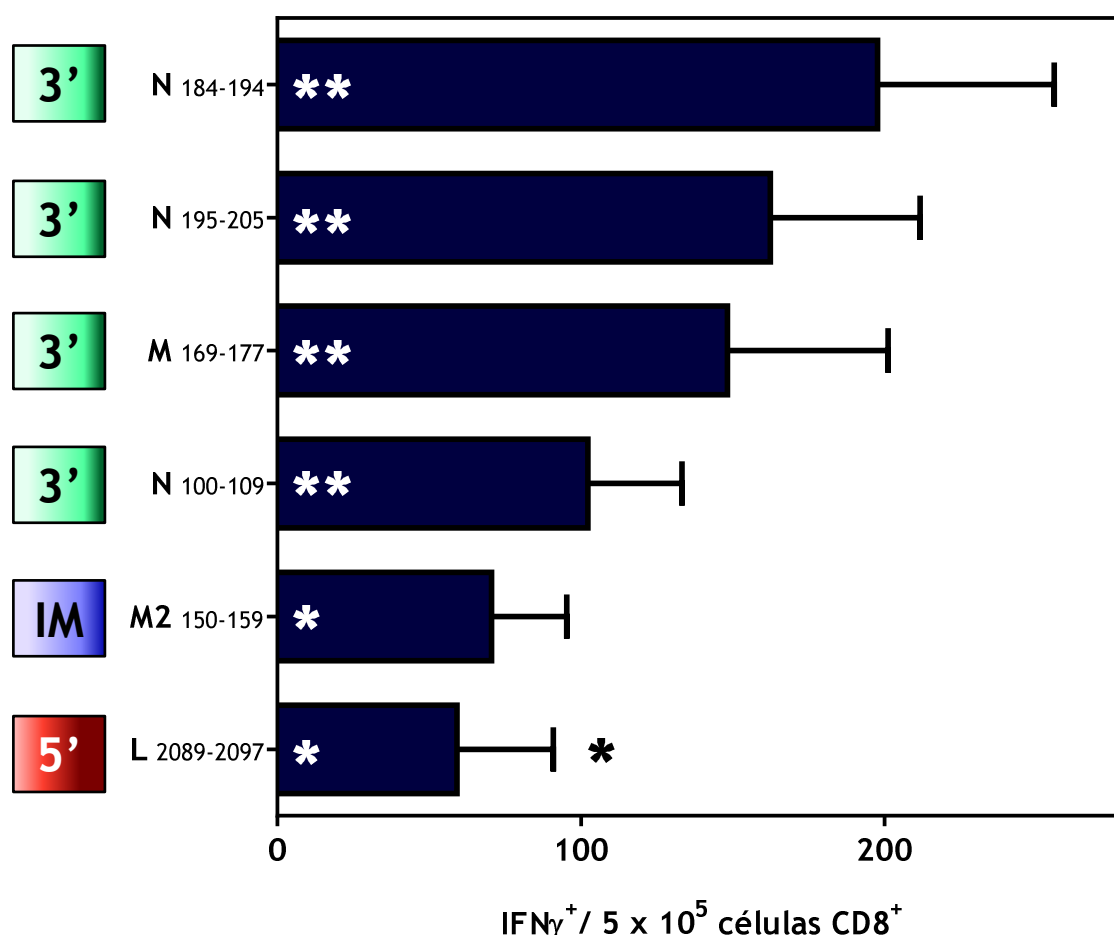


Figura 46. Inmunogenicidad de los ligandos virales de HRSV en ratones transgénicos para HLA-B*27:05. La activación de las células CD8⁺ se analizó mediante ensayos ELISPOT con células del bazo de ratones HLA-B*27:05⁺, tal y como se indica en la Figura 44. Los resultados representan la media de tres a nueve experimentos independientes.

Debido a la ausencia de modelos murinos transgénicos para las moléculas HLA-C*04:01 y -C*07:02, no se pudieron llevar a cabo ensayos de respuesta *in vivo* con los ligandos M₁₈₈₋₁₉₈ y G₂₅₋₃₃, asociados respectivamente a cada una de estas moléculas presentadoras de clase I.

3.8 Los grupos transcripcionales también determinan la respuesta de células T específica de HLA de clase I.

Teniendo en cuenta el número de epítomos identificados restringidos por las tres moléculas HLA de clase I estudiadas, se determinó que un 73% (8 de 11) de ellos provenían de proteínas codificadas por genes del grupo transcripcional 3', mientras que tan solo un 18% (2 de 11) o 9% (1 de 11) de los epítomos formaban parte de proteínas codificadas por genes de los grupos intermedio y 5', respectivamente (Figura 47).

Por otra parte, en cada uno de los modelos muridos transgénicos para HLA estudiados, los epítomos individuales pertenecientes al grupo 3' mostraron mayor respuesta de secreción de IFN γ específica que la desplegada por los ligandos de los grupos intermedio o 5', como se aprecia en las Figuras 44, 45 y 46. La cuantificación de la respuesta específica mediada por IFN γ en respuesta a los once epítomos presentados por las tres moléculas HLA de clase I reveló que un 91% de la respuesta global específica de células T se encuentra dirigida contra epítomos situados en las proteínas codificadas por genes del grupo transcripcional 3' (98% en HLA-A*02:01, 100% en -B*07:02 y 88% en -B*27:05), en tanto que los grupos intermedio y 5' únicamente contribuyen a la respuesta global con un 6% y un 3%, respectivamente (Figura 47). Por tanto, la jerarquía en la respuesta mediada por HLA de clase I específica de células T contra HRSV es dependiente del grupo transcripcional viral.

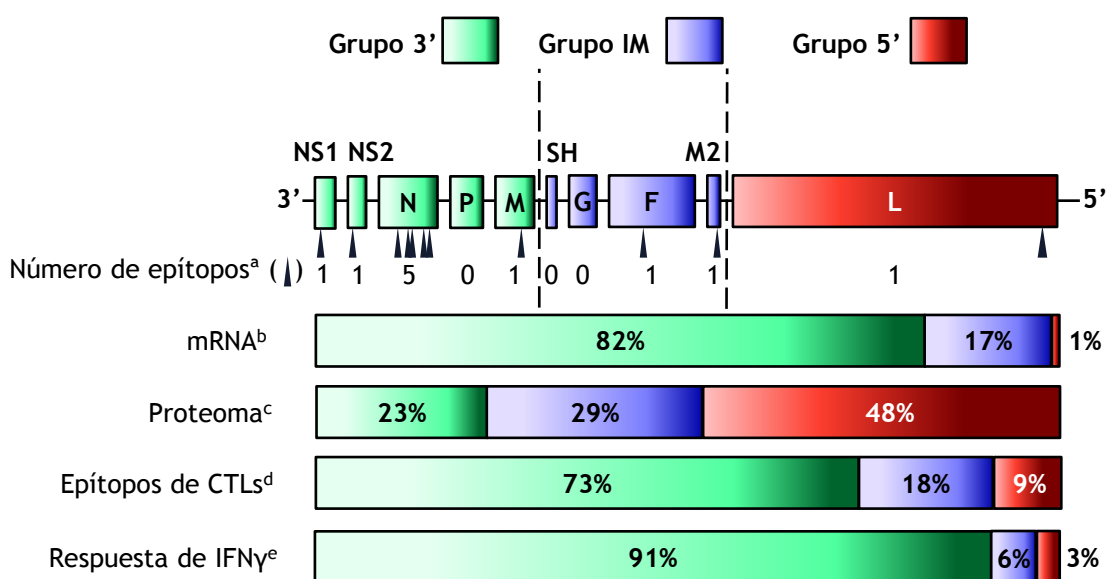


Figura 47. Relación de los epítomos de HRSV restringidos por HLA de clase I con el genoma, transcriptoma y proteoma de HRSV. Representación esquemática del genoma de HRSV siguiendo las convenciones de la Figura 41. En ^a se representa con un triángulo debajo de cada gen la posición de los epítomos restringidos por HLA de clase I aislados en células infectadas con HRSV. Asimismo, para cada gen se indica el número total de epítomos detectados. También se representan, tal y como se describe en la Figura 41, en ^b el gradiente transcripcional y en ^c el porcentaje de proteoma, así como en ^d el porcentaje de epítomos virales presentados por HLA de clase I detectados en cada grupo transcripcional y en ^e el porcentaje global de respuesta inmunológica mediada por IFN γ detectada en ratones transgénicos para las diferentes moléculas HLA de clase I.

3.9 La afinidad de unión de los ligandos de HRSV no influye en la capacidad de respuesta ni se ve afectada por la transcripción viral.

A continuación se llevaron a cabo diferentes análisis comparativos para evaluar la existencia de factores adicionales que pudieran influir en la magnitud de la respuesta inmunológica de células T secretoras de IFN γ para los epítomos de proteínas codificadas por genes del grupo transcripcional 3'. La primera hipótesis a comprobar consistía en si la afinidad de unión de los ligandos por sus moléculas

presentadoras podría determinar el grado de respuesta inmunológica medida como secreción de IFN γ , tal y como ocurría en el caso de los ligandos de HCV descritos anteriormente en la presente memoria (Figuras 10 y 11). No obstante, el análisis mostró una ausencia de correlación entre estos dos parámetros ($r^2 = 0,025$), por lo que la afinidad de unión de cada ligando no se relaciona con la respuesta de células T frente a los diferentes epítomos virales (Figura 48A).

Alternativamente, otra hipótesis considerada fue si los ligandos de HRSV más frecuentes (procedentes del grupo transcripcional 3') podrían ser de hecho los que mostrasen una menor afinidad y su presencia sólo se debiese a que son mucho más abundantes que otros ligandos, más afines pero menos frecuentes, provenientes de los grupos con menor tasa de transcripción. Sin embargo, al realizar un análisis comparativo entre la afinidad de unión de los diferentes ligandos y los grupos transcripcionales a los que pertenecían, se observó una ausencia total de correlación (Figura 48B). Por tanto, la capacidad de unión de los ligandos de HLA de clase I detectados por espectrometría de masas no viene determinada por el grupo transcripcional del cual derivan.

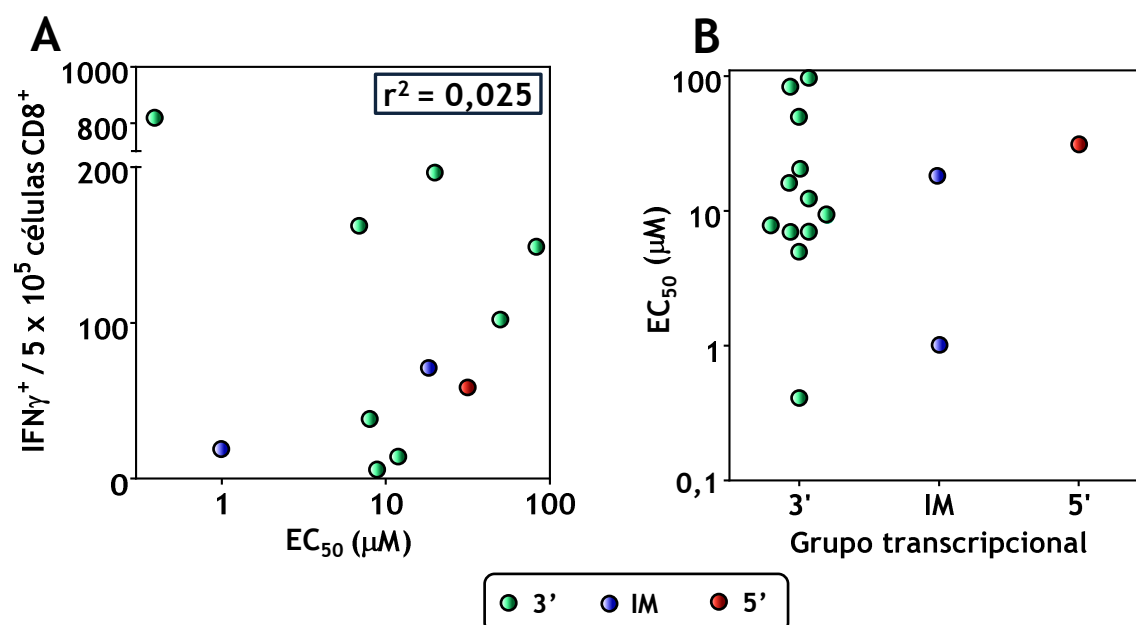


Figura 48. Análisis de la afinidad de los ligandos virales presentados por HLA de clase I frente a la respuesta de células T y a los grupos transcripcionales de HRSV. Los diferentes ligandos de HRSV se representan como puntos de distinto color atendiendo al grupo transcripcional al cual pertenecen, tal y como se indica en la leyenda. **Panel A:** Se representa en un diagrama de puntos la afinidad de unión a las moléculas HLA frente a la inmunogenicidad de los epítomos de HRSV, expresadas respectivamente como valores de EC₅₀ extraídos de los diferentes ensayos de estabilización (Figuras 17, 38 y 39) y la respuesta de células T IFN γ ⁺ obtenido en las Figuras 44, 45 y 46. El coeficiente de determinación se indica en el recuadro de la parte superior derecha. **Panel B:** Los diferentes valores de afinidad de unión de los péptidos virales sintéticos, expresados como las EC₅₀, se disponen en los grupos transcripcionales definidos tal y como se indica en la Figura 41.

3.10 El tamaño de las proteínas provenientes del grupo transcripcional 3' determina la inmunoprevalencia e inmunodominancia de la respuesta de clase I frente a HRSV.

Como se ha descrito previamente, el tamaño de las proteínas de HRSV no determina el número de ligandos de HLA de clase I que se generan (Figura 40), tal y como ilustra el hecho de que en la polimerasa, constituyendo casi la mitad del proteoma viral, solo se identificó un ligando en el conjunto de moléculas presentadoras analizadas. No obstante, un segundo análisis de correlación que incluía únicamente ligandos procedentes del grupo 3' reveló que la prevalencia de los ligandos de HLA de clase I provenientes de proteínas codificadas por genes de este grupo transcripcional es proporcional al tamaño respectivo de cada proteína viral (Figura 49).

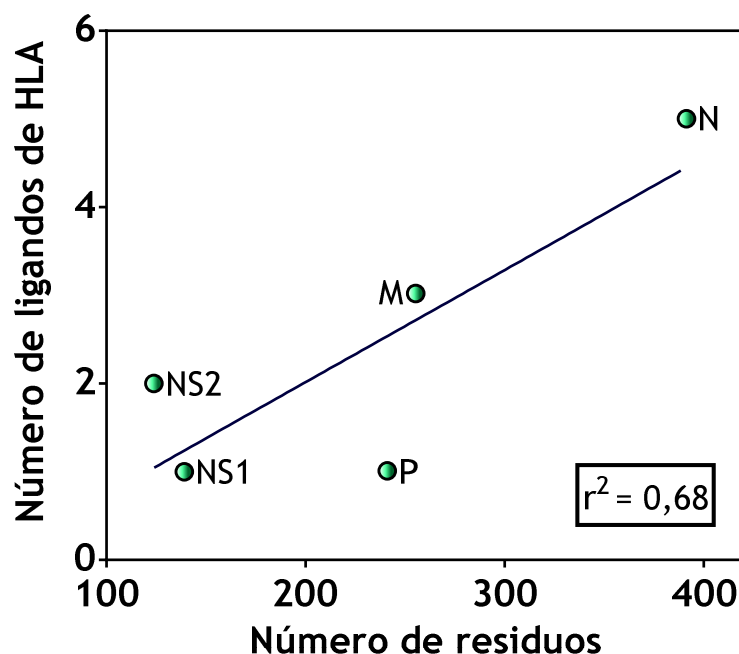


Figura 49. Relación entre el tamaño de las proteínas del grupo 3' y el número de ligandos de HLA de clase I derivados de ellas. Se muestra mediante un diagrama de puntos el número de ligandos frente al tamaño de las cinco proteínas del grupo transcripcional 3'. Además, se representa la recta obtenida por regresión lineal que mejor se ajusta a los puntos. El coeficiente de determinación se indica en el recuadro inferior derecho.

Como se puede observar, además de ser la proteína de mayor tamaño dentro del grupo 3' y por ello la mayor fuente de ligandos de HLA de clase I, la nucleoproteína de HRSV es la molécula contra la cual se focaliza la mayoría de la respuesta de células T restringida por HLA de clase I, tanto en número de epítomos (5 de 12 en el grupo transcripcional 3') como en respuesta global por IFN γ ⁺ (el 87% del grupo 3') (Figura 47). Es por ello que esta proteína sería, en vista a los datos aquí expuestos, la mejor candidata para formar parte de un vector vacunal diseñado para estimular la respuesta T citotóxica antiviral.

4 MIMETISMO ANTIGÉNICO ENTRE LIGANDOS RESTRINGIDOS POR HLA-B*27 PROCEDENTES DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y HUMANOS

4.1 La inmunización de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 con DNAP₂₁₁₋₂₂₁ genera células T capaces de reconocer específicamente DNAP₂₁₁₋₂₂₃.

Para evaluar la respuesta generada por dos ligandos bacterianos procedentes de la primasa de DNA (DNAP) del parásito intracelular humano *Chlamydia trachomatis* (Tabla 12) que previamente se habían postulado como posibles péptidos artríticos [207,208], así como la posible reactividad cruzada con el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ (Tabla 12) presentado por subtipos de HLA-B*27 asociados a SpA [209], se utilizó un modelo de ratones transgénicos para HLA-B*27:05. La inmunización de los animales se realizó mediante la inoculación por vía subcutánea de una emulsión de adyuvante incompleto de Freund que contenía uno de los péptidos bacterianos (DNAP₂₁₁₋₂₂₁ o DNAP₂₁₁₋₂₂₃) junto al epítipo adyuvante de la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B.

Tabla 12. Resumen de los ligandos utilizados para los ensayos ELISPOT en ratones transgénicos para HLA-B*27:05.

Péptido ^a	Organismo	Proteína	Longitud	Secuencia ^b	Referencia
B27 ₃₀₉₋₃₂₀	<i>Homo sapiens</i>	HLA-B*27	12	RRKSSGGKGGSY	[209]
DNAP ₂₁₁₋₂₂₁	<i>C. trachomatis</i>	Primasa de DNA	11	RRFKEGGRGGK	[207]
DNAP ₂₁₁₋₂₂₃	<i>C. trachomatis</i>	Primasa de DNA	13	RRFKEGGRGGKYI	[208]
H3.3 ₁₉₋₂₇ ^c	<i>Homo sapiens</i>	Histona H3.3	9	RRYQKSTEL	[210]

^a Los péptidos procedentes de *Chlamydia trachomatis* proceden del serovar L2.

^b Se muestran destacados en negrita los residuos de las secuencias bacterianas idénticos al ligando endógeno humano B27₃₀₉₋₃₂₀.

^c H3.3₁₉₋₂₇ se utilizó como control negativo.

En primer lugar se evaluó la respuesta mediada por IFN γ en ratones HLA-B*27:05⁺ de sexo masculino inmunizados con el undecámero bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₁ (Figura 50). Los resultados mostraron un reconocimiento específico del propio ligando bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₁. Asimismo, se observó una respuesta específica frente al tridecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de magnitud similar a la obtenida con el undecámero bacteriano. No se detectó respuesta de células T secretoras de IFN γ en los controles negativos que consistían en esplenocitos incubados sin estímulo alguno o incubados en presencia de otro ligando humano de HLA-B*27:05, el péptido H3.3₁₉₋₂₇. Finalmente, tampoco se detectó ninguna respuesta apreciable frente al ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀, con el cual se había propuesto reactividad cruzada.

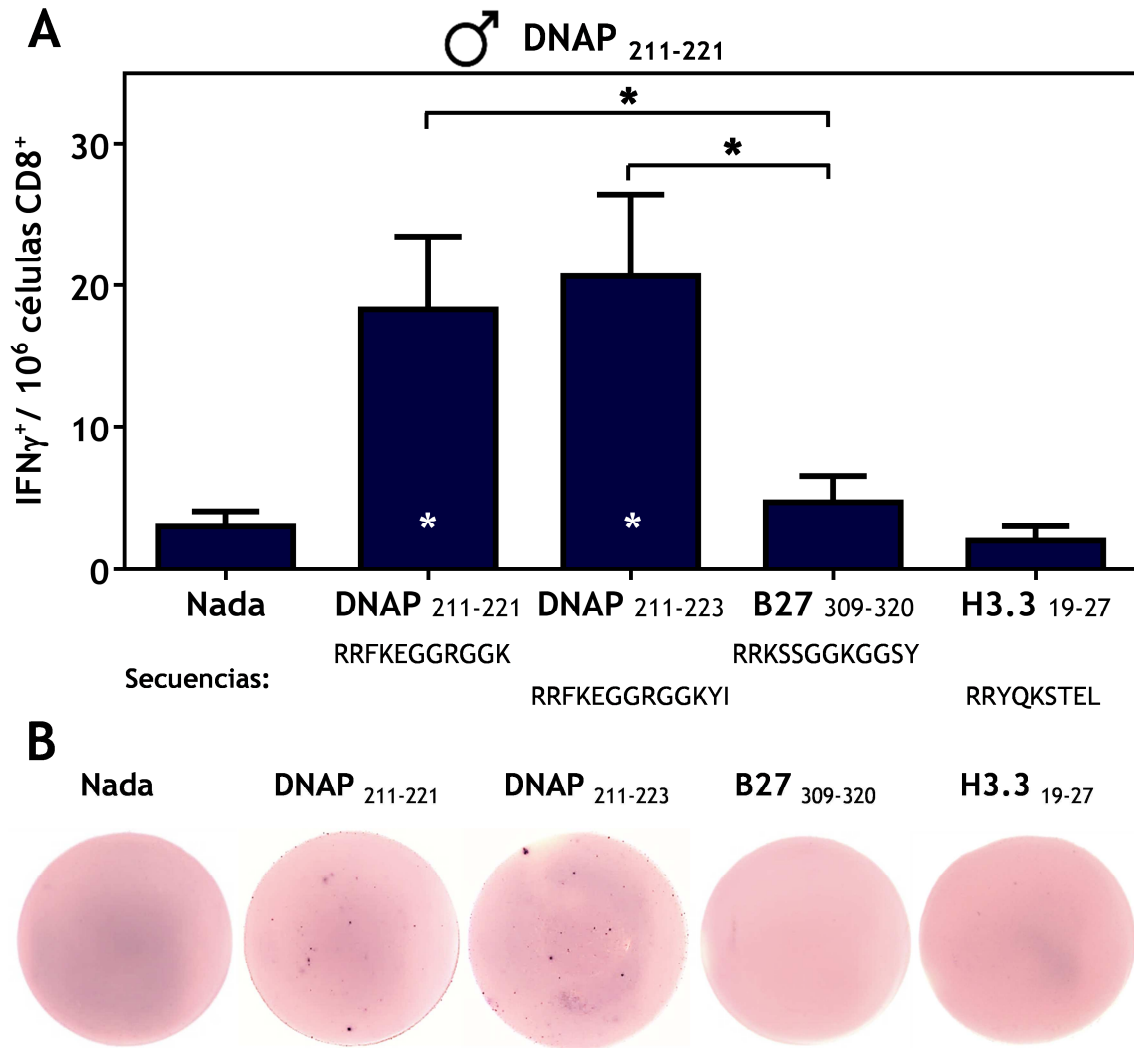


Figura 50. Inmunogenicidad del péptido DNAP₂₁₁₋₂₂₁ de *C. trachomatis* en ratones de sexo masculino transgénicos para HLA-B*27:05. **Panel A:** Las células de bazo procedentes de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 se estimularon con los péptidos sintéticos indicados en la parte inferior para cuantificar la respuesta mediada por IFN γ . Los resultados muestran la media de cuatro experimentos independientes realizados con ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₁. Los valores significativos ($p < 0,05$) se indican con un asterisco y se representan en color blanco o negro para señalar diferencias estadísticas respecto al control negativo sin péptido o respecto al péptido endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀, respectivamente. **Panel B:** Pocillos representativos de un ensayo de detección de IFN γ mediante la técnica ELISPOT. En la parte superior de cada pocillo se indica el péptido sintético utilizado.

Estos resultados indican que las células T restringidas por HLA-B*27:05 originadas contra DNAP₂₁₁₋₂₂₁ son capaces de reconocer específicamente el ligando extendido DNAP₂₁₁₋₂₂₃, pero no frente al péptido homólogo humano B27₃₀₉₋₃₂₀.

4.2 Las células T provenientes de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₃ son capaces de reconocer específicamente tanto el péptido bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₁ como el ligando endógeno humano B27₃₀₉₋₃₂₀.

Paralelamente a los ensayos descritos en el apartado anterior, se realizó el análisis de la respuesta de células T específica de péptido en ratones HLA-B*27:05⁺ de sexo masculino generada utilizando el tridecámero bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ como inmunógeno. Al igual que en el ensayo anterior, se comprobó el reconocimiento específico de los esplenocitos de los animales transgénicos inmunizados con este tridecámero frente a los péptidos bacterianos y endógenos mediante la técnica de detección de IFN γ por ELISPOT (Figura 51).

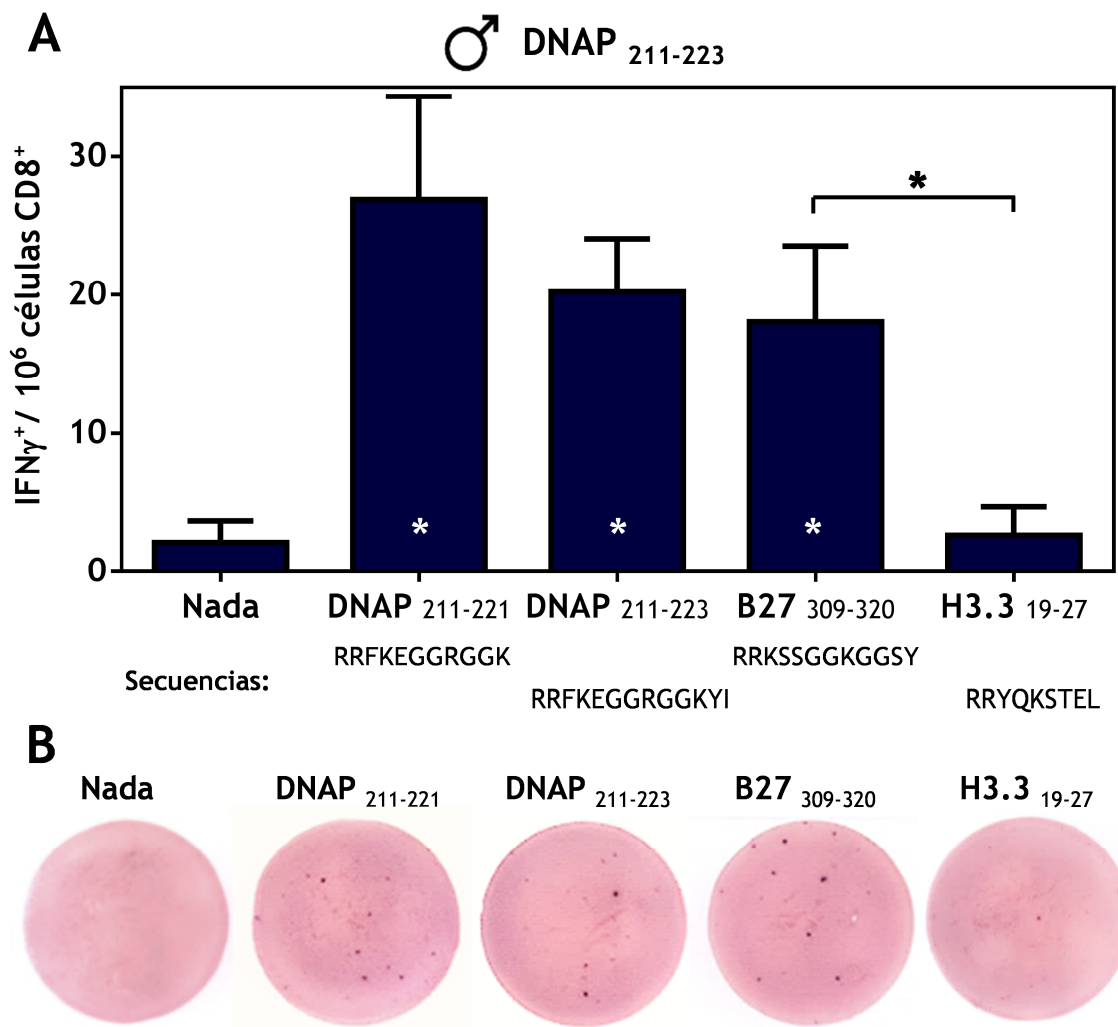


Figura 51. Inmunogenicidad del péptido DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de *C. trachomatis* en ratones de sexo masculino transgénicos para HLA-B*27:05. Los resultados obtenidos mediante la detección de IFN γ por ELISPOT en ratones transgénicos para HLA-B*27:05 con los distintos péptidos sintéticos se representan según las convenciones de la Figura 50. Los resultados muestran la media de cuatro experimentos independientes realizados con ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₃.

En estos ensayos se observó de nuevo reconocimiento específico de ambos péptidos bacterianos, el cual era complementario al descrito en el apartado anterior para los ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₁. De esta forma, los esplenocitos de ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₃ secretaban cantidades de IFN γ similares cuando se les estimuló con el undecámero bacteriano o con el propio tridecámero. Como en el caso anterior, los datos no revelaron respuesta alguna en ausencia de estímulo ni frente al péptido irrelevante restringido por HLA-B*27:05 H3.3₁₉₋₂₇. Sin embargo y muy destacablemente, las células del bazo activadas frente a DNAP₂₁₁₋₂₂₃ se estimularon también en presencia del ligando endógeno humano B27₃₀₉₋₃₂₀, alcanzando niveles de secreción de IFN γ similares a los obtenidos con los epítopos bacterianos (Figura 51).

Estos resultados indican que las células T restringidas por HLA-B*27:05 generadas contra el tridecámero de *Chlamydia* DNAP₂₁₁₋₂₂₃ muestran reconocimiento específico de tanto el péptido bacteriano corto DNAP₂₁₁₋₂₂₁ como el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀, el cual se presenta exclusivamente por los subtipos de HLA-B*27 asociados a la SpA.

4.3 Los péptidos bacterianos DNAP₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP₂₁₁₋₂₂₃ son incapaces de generar respuestas mediadas por IFN γ en ratones del haplotipo H-2^b.

Además del propio transgén humano, los ratones HLA-B*27:05⁺ poseen los genes para las moléculas del MHC de clase I correspondientes al haplotipo múrido H-2^b. Esta cepa transgénica carece de los genes para la B2 microglobulina múrida pero, debido a que dispone de los genes que codifican para la B2 microglobulina humana, los ratones expresan eficientemente las diferentes moléculas del MHC de ratón en la superficie de sus células [190]. Por tanto, con el objetivo de descartar la posible intervención de las moléculas del MHC múrido en la presentación de los péptidos sintéticos anteriormente descritos, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando la cepa C57BL/6 silvestre, que al igual que los ratones transgénicos para HLA-B*27:05 también expresa el haplotipo H-2^b. La metodología utilizada fue idéntica a la empleada en los ratones HLA-B*27:05⁺: los ratones de sexo masculino fueron inmunizados con cada uno de los dos péptidos de *Chlamydia* (DNAP₂₁₁₋₂₂₁ o DNAP₂₁₁₋₂₂₃) y posteriormente sus esplenocitos se enfrentaron a los diferentes péptidos endógenos y bacterianos en ensayos ELISPOT de secreción de IFN γ .

El análisis de los resultados reveló que la inmunización con los péptidos bacterianos inducía una secreción de IFN γ en los esplenocitos incubados con los diferentes péptidos sintéticos, tanto bacterianos como humanos, indistinguible estadísticamente de la registrada cuando las células del bazo se incubaban sin estímulo alguno. La ausencia de reconocimiento específico se observó tanto en los ratones C57BL/6 inmunizados con el undecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₁ (Figura 52A) como en los inmunizados con el tridecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₃ (Figura 52B).

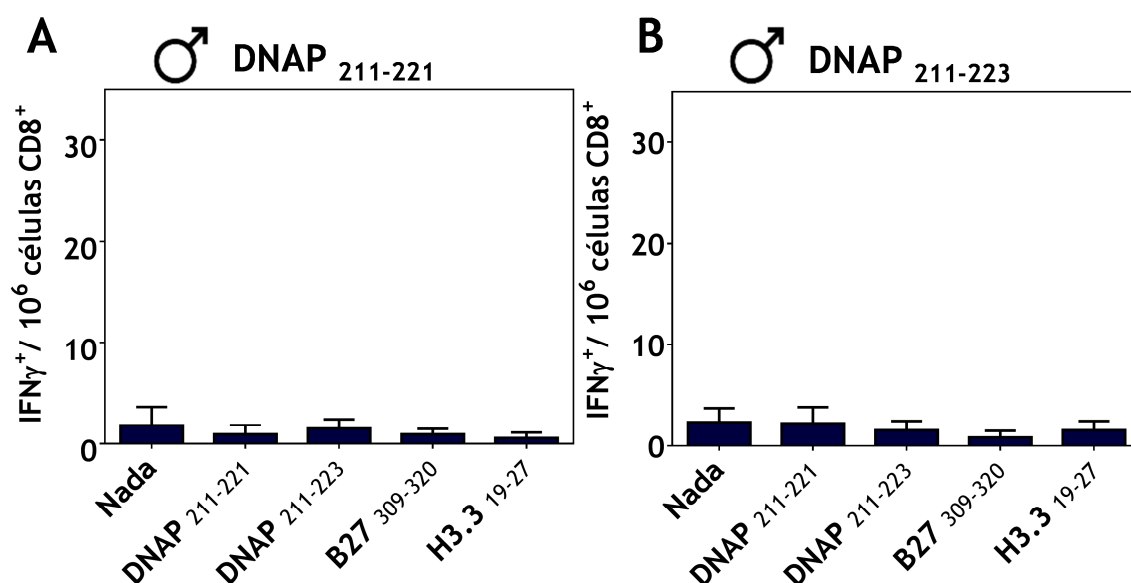


Figura 52. Inmunogenicidad de los péptidos DNAP₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de *C. trachomatis* en ratones C57BL/6 de sexo masculino. Las células de bazo procedentes de ratones C57BL/6 se estimularon con los péptidos sintéticos indicados en la parte inferior para cuantificar mediante ELISPOT la respuesta mediada por IFN γ . Los resultados muestran la media de dos experimentos independientes realizados con ratones inmunizados respectivamente con DNAP₂₁₁₋₂₂₁ (panel A) o DNAP₂₁₁₋₂₂₃ (panel B).

Estos datos indican que los péptidos derivados de la primasa de DNA de *Chlamydia* DNAP₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP₂₁₁₋₂₂₃ son incapaces de inducir respuestas de células T mediadas por IFN γ restringidas por moléculas del MHC de clase I H-2^b, confirmando por consiguiente que la respuesta obtenida en los animales transgénicos se encuentra restringida específicamente por la molécula HLA-B*27:05.

4.4 La reactividad cruzada entre el epítipo bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ y el ligando endógeno humano B27₃₀₉₋₃₂₀ se encuentra ausente en ratones transgénicos para HLA-B*27:05 de sexo femenino.

La cepa de ratones transgénicos para HLA-B*27:05 utilizada muestra una predisposición a desarrollar características clínicas relacionadas con la artritis, tales como cambios en las uñas, pérdida de pelo e inflamación en las patas traseras. Además, los ratones de sexo masculino desarrollan los síntomas en mayor proporción y con mayor severidad que los ratones de sexo femenino [190]. Teniendo en cuenta estas observaciones, se llevaron a cabo análisis de la respuesta mediada por células T para comprobar si existía alguna diferencia en la reacción cruzada entre el epítipo bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ y el péptido endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ registrada en ratones macho transgénicos para HLA-B*27:05 frente a la desarrollada en ratones hembra. De este modo, se llevaron a cabo experimentos de respuesta dependiente de IFN γ en ratones de sexo femenino inmunizados con el péptido de *C. trachomatis* DNAP₂₁₁₋₂₂₃, tal y como se había realizado previamente con los ratones macho.

Como se ha descrito en las secciones anteriores con ratones de sexo masculino, los esplenocitos de los ratones HLA-B*27:05⁺ de sexo femenino

inmunizados con el tridecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₃ mostraban respuesta frente a dicho péptido y reconocimiento del undecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₁. No obstante, no se observó respuesta frente al ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ por parte de los esplenocitos provenientes de ratones de sexo femenino, cuyos niveles de secreción de IFN γ fueron indistinguibles estadísticamente de los controles de células incubadas sin estímulo o con el péptido irrelevante H3.3₁₉₋₂₇ (Figura 53).

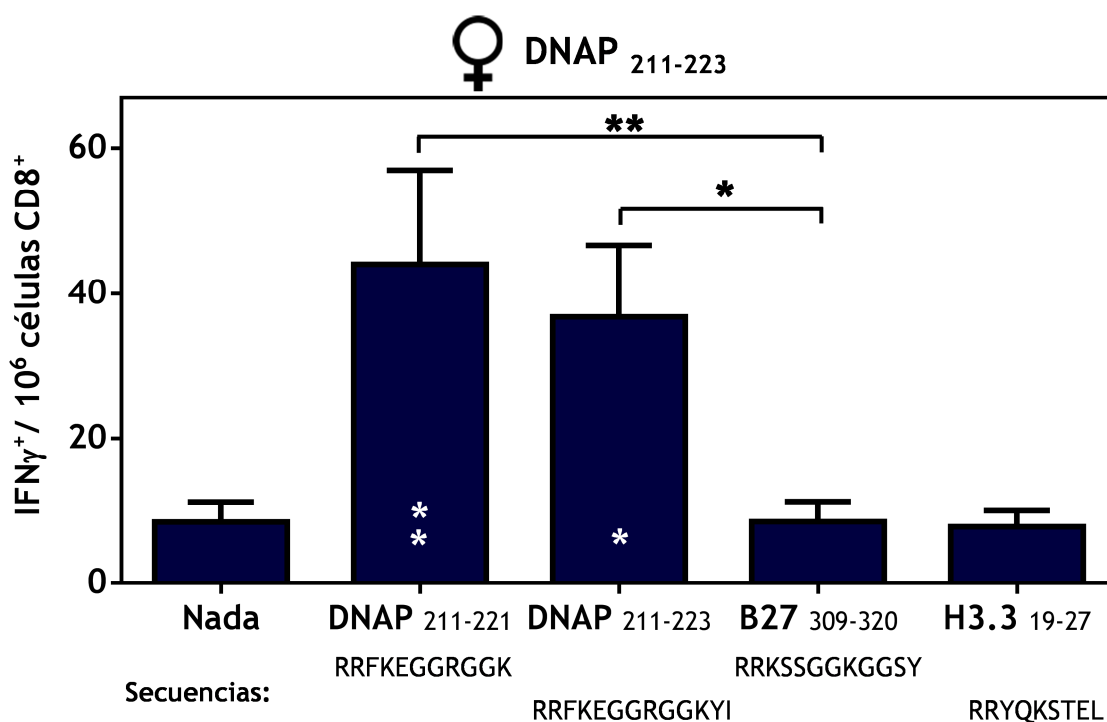


Figura 53. Inmunogenicidad del péptido DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de *C. trachomatis* en ratones de sexo femenino transgénicos para HLA-B*27:05. Los resultados obtenidos mediante la detección de IFN γ por ELISPOT en ratones de sexo femenino transgénicos para HLA-B*27:05 con los distintos péptidos sintéticos se representan según las convenciones de la Figura 50A. Los resultados muestran la media de cuatro experimentos independientes realizados con ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₁.

Por tanto, los datos obtenidos en ratones HLA-B*27:05⁺ hembra indican que los esplenocitos originados contra DNAP₂₁₁₋₂₂₃ son capaces de reconocer este péptido bacteriano así como su homólogo más corto DNAP₂₁₁₋₂₂₁, pero son incapaces de responder frente al epítipo B27₃₀₉₋₃₂₀ endógeno humano. Estos resultados contrastan notoriamente con los obtenidos en ratones de sexo masculino inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₃ (Figura 51), en los que se registró una reacción cruzada notable entre el ligando bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ y el ligando endógeno presentado por subtipos de HLA-B*27 asociados a SpA B27₃₀₉₋₃₂₀.

VIII. DISCUSIÓN

1 EL POLIMORFISMO DE LAS MOLÉCULAS DEL MHC DE CLASE I INFLUYE EN LA INMUNODOMINANCIA DE LOS EPÍTOPOS VIRALES

En el estudio de la respuesta inmunológica frente a HCV se habían identificado previamente tres epítomos de células T CD8⁺ restringidos por HLA-B*27 localizados en las posiciones 403-411, 424-432 y 519-527, respectivamente, de la proteína NS5B (Tabla 1) [168]. Dos de estos epítomos, NS5B₄₂₄₋₄₃₂ y NS5B₅₁₉₋₅₂₇, eran reconocidos frecuentemente en pacientes HLA-B*27:05⁺ con infecciones agudas por el genotipo 1 de HCV, y en donde aparecían repetidamente mutaciones de escape viral en infecciones crónicas. En el caso del epítomo inmunodominante NS5B₄₂₄₋₄₃₂, los cambios introducidos como consecuencia de las mutaciones de escape no afectaban al motivo de anclaje principal para la unión a HLA-B*27, Arg en P2. Sin embargo, estos cambios afectaban al reconocimiento específico de las células T secretoras de IFN γ ya que modificaban los residuos en posiciones 1, 4, 6 y 7 del epítomo [168]. Por otro lado, el epítomo NS5B₅₁₉₋₅₂₇ exhibía mutaciones de escape viral tanto en el motivo de anclaje principal de las moléculas HLA-B*27 como residuos considerados de contacto con el TCR, fundamentalmente en la posición 5. Consecuentemente, los ensayos previos determinaron que la capacidad de unión de los epítomos a HLA-B*27 se reducía drásticamente en las variantes con sustituciones en el residuo de Arg en P2, mientras que ésta no se veía afectada en absoluto en los mutantes en P5 [169]. En la presente tesis doctoral se ha procedido a analizar NS5B₄₀₃₋₄₁₁, el tercer epítomo viral restringido por HLA-B*27.

NS5B₄₀₃₋₄₁₁ se había considerado inicialmente una diana minoritaria para las células T CD8⁺ restringidas por HLA-B*27 dado que en la búsqueda inicial de epítomos en pacientes HLA-B*27⁺ con infección por HCV solamente se halló reconocimiento específico frente a este epítomo en un único individuo de origen siciliano con infección aguda por el subtipo 1a. Por el contrario, no se detectó respuesta alguna de células T CD8⁺ frente a este epítomo en dos cohortes de pacientes HLA-B*27:05⁺, constituidas respectivamente por seis individuos irlandeses y ocho alemanes, con infección por el subtipo 1b de HCV. El motivo de que la respuesta se limitase a un solo individuo no se debía a que la secuencia de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ fuese específica del subtipo viral que infectaba a este paciente puesto que la secuencia de este epítomo se encuentra conservada entre los diferentes genotipos y subtipos que infectaban al resto de sujetos. Curiosamente, el paciente siciliano era el único que expresaba el subtipo HLA-B*27:02 mientras que el resto de individuos expresaban el subtipo mayoritario B*27:05. Por ello, se realizó una búsqueda más exhaustiva de este epítomo en pacientes HLA-B*27:02⁺ con infección por HCV. Los análisis de secuencia viral de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ indicaron que en individuos HLA-B*27:02⁺ con infección crónica se detectaban muy frecuentemente (en el 92% de los casos) sustituciones de Arg por Lys en P2, el motivo de anclaje principal para HLA-B*27. Sin embargo, al realizar el mismo tipo de análisis en pacientes HLA-B*27:05⁺, estas sustituciones conservativas sólo aparecían en el 2% de los casos, de modo que se encontraban prácticamente ausentes. Estos datos sugerían que las variantes en P2 podrían tratarse de mutaciones de escape viral que evitarían la unión efectiva al elemento de restricción específico HLA-B*27:02.

Los datos de los ensayos de estabilización de complejos péptido-HLA expuestos en esta memoria de tesis sugieren que la restricción de la respuesta frente a NS5B₄₀₃₋₄₁₁ por exclusivamente el subtipo HLA-B*27:02 podría deberse a una mayor afinidad de unión del epítipo a este subtipo de HLA-B*27 particular, mientras que en B*27:05 la unión sería más débil (Figuras 10 y 11). Esta diferencia podría ser suficiente para que la presentación de este epítipo por HLA-B*27:05 disminuyera y la respuesta por células T CD8⁺ se concentrara en el resto de epítopos, especialmente NS5B₄₂₄₋₄₃₂. Asimismo, los datos muestran que la sustitución en NS5B₄₀₃₋₄₁₁ del residuo de Arg por Lys en P2 afecta gravemente a la capacidad de unión a la molécula HLA-B*27:02 (Figura 12). El péptido que posee Lys en el motivo de anclaje principal para HLA-B*27 muestra tan solo una unión muy residual a la molécula de clase I que muy probablemente impida su presentación efectiva por HLA-B*27:02 en la membrana de los hepatocitos infectados, imposibilitando el reconocimiento por células T CD8⁺ específicas del epítipo silvestre. Por tanto, estos resultados indican que el cambio conservativo de Arg por Lys podría tratarse de una mutación de escape viral consecuencia de la presión selectiva ejercida por las células T CD8⁺ en el contexto de únicamente HLA-B*27:02.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos paralelamente por el grupo del Dr. Neumann-Haefelin de la Universidad de Friburgo, con el cual se mantuvo una colaboración. Este equipo observó que las líneas de CTLs específicas de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ obtenidas en el paciente HLA-B*27:02⁺ eran incapaces de reconocer el epítipo presentado en líneas celulares linfoblastoides B*27:05⁺, aunque sí respondían cuando se utilizaban líneas B*27:02⁺. Además, la sustitución de Arg por Lys en P2 de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ impedía totalmente el reconocimiento específico por líneas de CTLs específicos de NS5B₄₀₃₋₄₁₁ que, por otra parte, sí respondían específicamente frente a células cargadas con el epítipo que poseía Arg en P2. Estos datos, en conjunto con los presentados en esta memoria, apoyan la conclusión de que las diferencias observadas en la inmunodominancia frente al epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ en pacientes con diferentes alelos de HLA-B*27 se deben principalmente a las características diferenciales de unión a los subtipos, aunque no se puede descartar el posible papel de otros factores como, por ejemplo, la diferente frecuencia de precursores indiferenciados de células T específicos del mencionado epítipo [211].

Además, los datos expuestos en esta tesis permiten explicar por qué NS5B₄₀₃₋₄₁₁ se había catalogado en principio como un epítipo subdominante en la respuesta global mediada por HLA-B*27. Dado que se había obviado el polimorfismo dentro de la familia HLA-B*27, el perfil de inmunodominancia frente a los distintos epítopos de NS5B venía determinado por la variedad y proporción de los subtipos de HLA-B*27 analizados en cohortes europeas. De este modo, los epítopos restringidos por el subtipo prototípico HLA-B*27:05, más abundante en las poblaciones del norte de Europa, siempre serían más frecuentes que los presentados por HLA-B*27:02, un subtipo habitual en habitantes de la cuenca mediterránea pero poco común a nivel global (Figura 4). Sobre esta base y teniendo en cuenta que en las poblaciones asiáticas los alelos B*27:02 y B*27:05 son muy minoritarios entre los individuos HLA-B*27⁺ mientras que B*27:04 y B*27:06 son los predominantes (Figura 4), se procedió a realizar un análisis de la afinidad de unión en estos dos subtipos con los tres epítopos virales. La importancia de este trabajo reside en que hasta la fecha no se ha

realizado ningún estudio acerca de la respuesta de células T en pacientes orientales infectados con HCV. Los resultados obtenidos sugieren que el epítipo descrito como inmunodominante para HLA-B*27:05, NS5B₄₂₄₋₄₃₂, tendría una importancia marginal en la respuesta restringida por HLA-B*27:04 ya que su capacidad de unión es considerablemente menor que en otros subtipos (Figura 13 y Tabla 2). Igualmente, los datos obtenidos en HLA-B*27:06 señalan que el epítipo NS5B₅₁₉₋₅₂₆ probablemente no tenga ninguna relevancia en la respuesta restringida por este subtipo puesto que su afinidad de unión por la molécula de clase I es bastante limitada respecto al resto de epítipos (Figura 14). Aunque serían necesarios estudios que validasen estas predicciones y analizaran la presencia de nuevos epítipos de HCV en pacientes B*27:04⁺ y B*27:06⁺, todos estos datos en conjunto apoyan la conclusión de que la diversidad genética del hospedador a nivel de subtipo tiene un impacto importante en el reconocimiento de epítipos. Esta variabilidad genética podría afectar a las respuestas inmunológicas protectoras del mismo modo que influye la diversidad genética en HCV, donde los diferentes genotipos contienen o no epítipos protectores específicos [212].

Aunque la capacidad protectora de HLA-B*27 frente a la infección por HCV se encuentra generalmente aceptada, los datos epidemiológicos de los que se dispone hasta la fecha son todavía escasos. El primer estudio que describe el papel protector de HLA-B*27 frente a la infección por HCV se llevó a cabo en cohortes de pacientes irlandeses, donde la población expresa casi exclusivamente el alelo HLA-B*27:05 [159]. Un segundo estudio que analizaba las frecuencias alélicas de pacientes estadounidenses en espera de una trasplante hepático debido a HCV, cohorte donde B*27:05 es considerablemente el alelo más común, también apoyaba el papel protector de HLA-B*27 aunque más moderadamente [213]. Por último, en contraste con los trabajos mencionados previamente, un estudio realizado con pacientes en Alemania determinó que HLA-B*27 tenía un efecto neutral frente a la infección por HCV [214]. Todos estos estudios ponen de relieve la ausencia de datos que analicen el impacto del polimorfismo de HLA de clase I a alta resolución (es decir, a nivel de subtipo) en el curso de la infección por HCV. Este tipo de trabajos podrían determinar si los subtipos HLA-B*27:02, -B*27:04 y -B*27:06 tienen un efecto protector similar o diferente a HLA-B*27:05 frente a la infección por HCV u otros patógenos, como HIV, para los cuales HLA-B*27 se ha definido como un factor protector [215]. En este sentido, pese a que únicamente se utilizó como control positivo en los ensayos, los resultados obtenidos con el péptido derivado de gap p24 de HIV indican que, aunque se trate del epítipo inmunodominante en la respuesta restringida por HLA-B*27 frente a este retrovirus [186], podría ser relevante únicamente en el contexto de subtipos en los que se muestra como un ligando de alta afinidad, como HLA-B*27:02 y -B*27:05, pero no en otros subtipos en los que la capacidad de unión es más limitada como son HLA-B*27:04 y -B*27:06 (Tabla 2).

Los resultados de la presente tesis, además, estarían en consonancia con algunos estudios previos sobre los efectos diferenciales en el curso clínico de la infección para otros subtipos de moléculas HLA. Por ejemplo, a diferencia de los subtipos de riesgo HLA-B*35:03 y -B*35:02, el subtipo HLA-B*35:01 se considera de carácter neutral para la infección por HIV a pesar de diferir de los subtipos perjudiciales en solo uno o dos cambios, respectivamente [216]. Aún más llamativa es

la observación de que aunque se diferencian en sólo tres residuos, los subtipos HLA-B*58:01 y -B*58:02 muestran efectos antagónicos en el control de la viremia de HIV dado que el primero es protector y el segundo de riesgo frente a la infección retroviral [217]. Igualmente, HLA-B*38 es un factor de riesgo para la infección por HCV mientras que las moléculas altamente relacionadas de B*39 son protectoras, aun cuando únicamente se diferencian entre sí en seis residuos en los subtipos con mayor homología [213]. Por todo ello, aunque las diferencias entre moléculas HLA de clase I estrechamente relacionadas sean de unos pocos residuos, estos cambios pueden ser relevantes tanto en el reconocimiento por las células T CD8⁺ como en el control inmunológico de la infección.

Por otra parte, los resultados expuestos en la presente memoria ponen de relieve la necesidad de incorporar el efecto del polimorfismo de HLA de clase I en la evaluación de la respuesta inmunológica mediada por células T CD8⁺. En el caso de HCV, la identificación de epítomos específicos de células T CD8⁺ se ha llevado a cabo principalmente en individuos caucásicos de Europa y América del Norte. Como en estos trabajos no se han considerado los diferentes subtipos de HLA de clase I, no se conoce con precisión la restricción por moléculas HLA exacta para la mayoría de los epítomos. Esto se debe a que habitualmente las familias HLA se definen por un subtipo prototípico que se encuentra mayoritariamente representado dentro de una población, como es HLA-A*02:01 para la familia HLA-A*02, B*07:02 para B*07 o B*27:05 para B*27. Sin embargo, la prevalencia de estos subtipos prototípicos puede disminuir hasta el punto de hallarse infrarrepresentado o incluso ausente dentro de un grupo étnico determinado (*Allele Frequency Net Database* [218]). Por tanto, las formulaciones vacunales poliepitópicas diseñadas a partir de los datos de este tipo de estudios podrían ofrecer una cobertura antigénica muy escasa en poblaciones o etnias cuyos subtipos de HLA difieran bastante de los prototípicos, dado que se excluirían epítomos de células T CD8⁺ protectores que estarían restringidos por moléculas HLA minoritarias. Este polimorfismo debería tenerse en cuenta sobre todo en regiones donde existen mezclas étnicas heterogéneas debido a los constantes flujos migratorios, como es el caso de Estados Unidos, Europa u Oriente Medio. Por todo ello, los hallazgos indicados en esta memoria podrían tener importantes implicaciones en la búsqueda de determinantes antigénicos y el diseño de vacunas frente a HCV ya que señalan la importancia del polimorfismo de HLA de clase I en la respuesta frente a diferentes epítomos. Además, aunque aún son necesarios estudios adicionales que determinen el efecto de los diferentes subtipos de HLA de clase I sobre epítomos individuales de diferentes virus, las observaciones aquí recogidas también podrían ser aplicables a los muchos patógenos en los cuales el papel de las células T CD8⁺ sea esencial en el control de la infección.

Asimismo, es pertinente señalar que en ocasiones los tipos y subtipos de HLA menos frecuentes son los que pueden contribuir más determinadamente en el control de ciertas infecciones virales específicas [219]. Al fin y al cabo, después de las colonizaciones y otros movimientos poblacionales a gran escala, el factor que ha configurado la frecuencia relativa de los alelos HLA en las diferentes regiones geográficas es la presión ejercida por parásitos locales [220]. Esto se debe a que si el control de alguno de estos patógenos específicos se encuentra favorecido por algún subtipo de HLA concreto, por minoritario que fuese, la población afectada se

enriquece en el gen que codifica para dicha molécula HLA como consecuencia de la morbilidad reducida y supervivencia selectiva de los individuos que expresan estos subtipos protectores. Llegado un momento, la presencia del alelo protector queda fijada en el acervo genético de la población y el subtipo de HLA clase I pasa a ser predominante dentro de todo el conjunto de moléculas de clase I. En la familia HLA-B*27 en particular, se ha sugerido que la distribución global de los diferentes alelos podría estar determinada por la prevalencia de malaria, ya que en las áreas tropicales y ecuatoriales donde esta enfermedad es endémica se concentran los subtipos diferentes de HLA-B*27:05, mientras que esta molécula prototípica muestra alta prevalencia en latitudes más templadas o frías [76]. Todas estas nociones, en conjunción con los datos mostrados en esta memoria, indican que los estudios de vacunología deberían extenderse para incluir análisis más exhaustivos y globales de determinación de la respuesta en los diferentes subtipos. El objetivo de estos extensos análisis sería obtener una cobertura más amplia de los epítomos potenciales de CTLs, algunos de los cuales podrían ser fundamentales para combatir la infección.

2 RELEVANCIA DE LOS MOTIVOS DE ANCLAJE MÍNIMOS COMUNES PARA HLA-B*27

Utilizando análisis por espectrometría de masas a gran escala se ha logrado un conocimiento muy detallado del ligandoma de HLA-B*27:05 puesto que se han identificado más de 5.000 péptidos hasta la fecha [72,221-223]. Estos estudios han determinado de forma muy precisa la composición de los motivos de anclaje, tanto el principal como los considerados secundarios o auxiliares para este subtipo particular [73,222]. No obstante, hasta fechas muy recientes el conocimiento de los motivos de anclaje auxiliares y/o secundarios para el resto de subtipos de HLA-B*27 era muy limitado, pues únicamente se disponía de un número escaso de secuencias peptídicas asociadas a los diferentes subtipos. Además, no se había descrito ninguna característica que permitiera a un ligando ser presentado por la mayoría de subtipos de la familia HLA-B*27. Por todo lo ello, uno de los objetivos de la presente tesis ha consistido en alcanzar un conocimiento más detallado de los motivos de anclaje de las moléculas de la familia HLA-B*27, individualmente (preferencia de aminoácidos para cada subtipo) y en conjunto (motivos de anclaje comunes para todos los subtipos).

De esta forma, los ensayos de estabilización de complejos de péptidos sintéticos virales con moléculas HLA en células deficientes en TAP transfectadas con diferentes subtipos de moléculas HLA-B*27 han permitido configurar una panorámica del efecto del polimorfismo de B*27 (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de la afinidad relativa de péptidos virales en diferentes subtipos de HLA-B*27.

Péptido	Secuencia ^a	B*27:05	B*27:03	B*27:04	B*27:06	B*27:09	B*27:01	B*27:02
L 2089-2097	GRNEVFSNK	^b						
M 76-84	SRSALLAQM							
M 169-177	VRNKDLNTL							
M2 150-159	KRLPADVLKK							
NP 100-109	HRQDINGKEM							
NP 184-194	RRANNVLKNEM							
NP 195-205	KRYKGLLPKDI							
NS2 37-45	HRFIYLIH							
P 198-208	LRNEESEKMAK							
HIV gp160 500-508	KRAVGIGAL							
MV F 438-446	RRYPDAVYL							
Flu PB1 238-246	RRAIATPGM							
RRA ₇ I	RRAAAAAAI							
Flu NP	SRYWAIRTR							

^a Los nuevos motivos de anclaje para la unión eficiente a HLA-B*27 se encuentran subrayados.

^b La afinidad de los péptidos sintéticos se representa con tonalidades sucesivamente más intensas de rojo, como se indican en la leyenda inferior, atendiendo al orden decreciente de valores de EC₅₀ (no unión, >200 μM, 200-61 μM, 60-20 μM y <20μM), tal y como se describía en la Tabla 8.

Nada	>200	60-200	20 - 60	< 20
------	------	--------	---------	------

Así, el análisis de los resultados ha permitido identificar la secuencia Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Leu/Met como la estructura peptídica mínima común para la unión eficiente de péptidos a siete subtipos de HLA-B*27 diferentes tanto filogenética como funcionalmente (Figura 15) [224,225] y, por extensión, probablemente a todas las moléculas del grupo alélico HLA-B*27 en general. Esta estructura tendría relevancia en el diseño racional de vacunas e inmunógenos cuyo objetivo sea estimular la respuesta de células T CD8⁺ restringida por muchas o todas las moléculas de la familia HLA-B*27, ya que éstas se encuentran distribuidas diferencialmente entre las diversas poblaciones humanas (Figura 4). Por ello, un péptido que disponga de los motivos de anclaje comunes determinados en la presente memoria será *a priori* un buen candidato para obtener respuestas de células T en el conjunto de individuos HLA-B*27⁺, sea cual fuere su alelo específico. Aun así, no se puede descartar la influencia de otros factores en la eficacia de un epítipo como agente inmunogénico, como son las diferencias en distintos elementos de la respuesta inmune como citoquinas y receptores de superficie [226], polimorfismos en la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica [227,228] o el grado de conservación del epítipo entre diferentes variantes y cepas del patógeno [229,230].

Asimismo, estos datos pueden ser relevantes en el estudio de la etiología de las SpAs, ya que de existir uno o varios péptidos artrítogénicos que desencadenaran estas enfermedades, éstos no deberían contener ni los motivos de anclaje mínimos

aquí descritos ni ningún motivo de anclaje que garantizase su unión efectiva a los subtipos protectores. En este sentido, se ha sugerido que los péptidos artríticos podrían poseer Tyr en PΩ, residuo que permitiría la unión a los subtipos asociados a la enfermedad pero impediría la unión del ligando a los subtipos protectores HLA-B*27:06 y -B*27:09, debido al cambio en común a ambos de Asp en el residuo 116 de la cadena pesada (presente en B*27:05) por Tyr o His, respectivamente [231,232].

En trabajos previos se habían llevado a cabo análisis exhaustivos de respuestas de células T alorreactivas de individuos negativos para HLA-B*27 contra los subtipos B*27:02 [233], B*27:03 [225], B*27:04 [234], B*27:05 [225] y B*27:09 [235], cuyo fin era comprobar el grado de solapamiento de epítomos de células T entre diferentes subtipos. Estos estudios definían semejanzas funcionales entre las diferentes moléculas en el orden B*27:05 > B*27:09 > B*27:03 > B*27:02 > B*27:01 > B*27:04 > B*27:06. Este grado de solapamiento funcional coincide, en general, con los cambios en aminoácidos entre los diversos subtipos de HLA-B*27. No obstante, a diferencia de cuando se produce reconocimiento de epítomos de patógenos restringidos por moléculas HLA propias, estos clones de CTLs anti-HLA-B*27 pueden reconocer tanto los péptidos propios endógenos como diferentes residuos —incluidos los polimórficos— de la molécula del MHC alógena [172], los cuales también contribuyen en el determinante antigénico que reconoce el CTL alógeno. De esta forma, los datos procedentes de estos estudios podrían ocultar tanto las propiedades de reactividad cruzada de los propios ligandos como el grado de relación funcional entre los diferentes subtipos de HLA-B*27. Por el contrario, los resultados mostrados en esta tesis doctoral únicamente se basan en los patrones de afinidad de varios de péptidos frente a los diferentes subtipos. Dado que las células en las que se han realizado los ensayos poseen maquinarias de procesamiento y presentación de antígenos similares, si no idénticas, los resultados aquí mostrados señalan una relación funcional entre los diferentes subtipos marcadamente diferente al obtenido mediante respuestas inmunológicas alógenas, ya que se dispondría en el orden B*27:05 > B*27:09 > B*27:06 > B*27:04 > B*27:03 > B*27:01 = B*27:02. Asimismo, la asociación funcional entre subtipos que se ha establecido en la presente memoria mediante ensayos de afinidad con ligandos virales podría ser una aproximación más conveniente para determinar las propiedades de presentación de antígenos peptídicos en moléculas HLA-B*27, y esta información podría ser fácilmente aplicable al diseño racional de vacunas.

Pocos estudios han analizado la unión antigénica y/o la presentación de los mismos ligandos virales por diferentes subtipos de HLA-B*27. Crotzer *et al.* analizaron cuatro ligandos del virus de Epstein-Barr (EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆, RRIYDLIEL; EBNA3B₂₄₃₋₂₅₃, RRARSLAERY; LMP2₂₃₆₋₂₄₄, RRRWRRLTV; EBNA3C₃₄₃₋₃₅₁, FRKAQIQGL) en relación a los subtipos B*27:02, B*27:04 y B*27:05, y observaron que únicamente el ligando EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ se reconocía en el contexto de los tres subtipos estudiados, mientras que LMP₂₃₆₋₂₄₄ se reconocía exclusivamente asociado a B*27:04 [236]. Sin embargo, en un estudio diferente, el ligando LMP₂₃₆₋₂₄₄ también se reconocía en el contexto de los cinco subtipos de HLA-B*27 analizados (B*27:02, B*27:04, B*27:05, B*27:06 y B*27:09), aunque únicamente por uno de los varios clones de CTLs utilizados {Fiorillo, 1998 1872 /id}. Por otra parte, los ligandos HIV gag₂₆₅₋₂₇₉ (KRWIILGNKIVMYC) y Flu NP₃₈₀₋₃₉₃ (ELRSRYWAIRTRSG) se presentan por tanto el

subtipo B*27:02 como el B*27:05 [238]. Por último, tal y como se ha descrito en esta misma memoria, el péptido NS5B₄₀₃₋₄₁₁ de HCV (ARHTPVNSW) se encuentra asociado a HLA-B*27:02 pero no a B*27:05 (Figuras 10 y 11). De los siete epítomos virales anteriormente mencionados, únicamente EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ presenta el motivo de anclaje mínimo para la unión eficiente descrito en la presente memoria de tesis, y dicho péptido se encontraba restringido por los tres subtipos de HLA-B*27 analizados (B*27:02, B*27:04 y B*27:05). Por otra parte, de entre los ligandos endógenos de HLA-B*27 procedentes de proteínas humanas, el procedente de la histona H3.3 (H3.3₁₉₋₂₇) es el único descrito con capacidad de unión a todos los subtipos de HLA-B*27 analizados: B*27:01 [171], B*27:02 [239], B*27:03 [240], B*27:04 [241], B*27:05 [210], B*27:06 [241] y B*27:09 [177]. Este ligando, correspondiente a la secuencia RRYQKSTEL, también posee un aminoácido básico en el extremo N-terminal y una cadena lateral hidrofóbica voluminosa en el residuo C-terminal, lo cual es consistente con los motivos de anclaje descritos en esta tesis.

Si bien los primeros estudios que intentaban identificar los motivos de anclaje disponían de una resolución bastante limitada, dado que sólo se obtenían unas pocas decenas de secuencias para cada subtipo de HLA-B*27 [75], recientemente se han realizado sendos trabajos utilizando espectrometría de masas que han permitido un conocimiento más exhaustivo de las secuencias peptídicas restringidas por los diferentes subtipos de HLA-B*27 (Tabla 14). Por un lado, en el estudio realizado por García-Medel *et al.* se describieron más de 2.000 ligandos diferentes presentados por siete subtipos distintos [222]. De este modo, se identificaron 1.120 secuencias en B*27:02, 510 en B*27:03, 1.046 en B*27:04, 1.120 en B*27:05, 555 en B*27:06, 768 en B*27:07 y 743 en B*27:09, si bien muchas de estas secuencias son comunes entre diferentes subtipos. Este análisis identifica residuos hidrofóbicos y aromáticos como los más abundantes en PΩ en los diferentes subtipos de B*27, mientras que la preferencia en P1 resultó más difusa, con abundancia de Ala, Gly, His, Lys y Ser. No obstante, algunos subtipos exhibían notables excepciones: aquellos que poseen el cambio en la posición 116 respecto a B*27:05 no suelen acomodar péptidos con Tyr C-terminal, mientras que el subtipo B*27:03 presenta preponderantemente aminoácidos básicos en P1. Posteriormente, en el trabajo realizado por Schittenhelm *et al.* se llevó a cabo la secuenciación de más de 7.500 péptidos de ocho alelos diferentes, obteniendo 3.417 secuencias en B*27:02, 926 en B*27:03, 1.283 en B*27:04, 2.132 en B*27:05, 1.196 en B*27:06, 2.185 en B*27:07, 2.185 en B*27:08 y 2.276 en B*27:09, aunque de nuevo muchas eran compartidas entre los subtipos [223]. Los datos de este trabajo sobre los motivos de anclaje identificados para cada subtipo son consistentes con las conclusiones extraídas en la presente memoria y los datos obtenidos en el estudio anteriormente comentado. Ahora bien, el estudio de Schittenhelm *et al.* postula una ausencia de ligandos con Met en PΩ en HLA-B*27:02 que no concuerda con los resultados expuestos en la presente tesis (Figuras 23 y 37) ni con los datos recogidos por García-Medel *et al.* Sin embargo, pese a esta discrepancia, los motivos de anclaje mínimos comunes identificados en la presente memoria (Arg o Lys en P1 e Ile, Leu o Met en PΩ) son habituales en todos los ligandos de los subtipos de HLA-B*27 evaluados por espectrometría de masas en ambos estudios, si bien no son necesariamente los aminoácidos más frecuentes tal y como ilustra el ejemplo de que los residuos de Ile y Met se encuentran presentes en PΩ en todos los subtipos aunque solamente en alrededor del 5% de los ligandos naturales [222].

Tabla 14. Motivos de anclaje para los subtipos de HLA-B*27 identificados por espectrometría de masas.

	B*27:02	B*27:03	B*27:04	B*27:05	B*27:06	B*27:09
P1		H, K ^a		G	G	
P2	R	R	R	R	R	R
PQ	F, Y, L	F, Y, L	F, Y, L	F, L	F, L	F, L

^a Los motivos de anclaje se representan por el código de aminoácidos de una letra y muestran únicamente los residuos que aparecen en más del 20% de los ligandos. Los datos provienen del trabajo de García-Medel *et al.* (en tipografía normal) [222] y de Schittenhelm *et al.* (en cursiva) [223]. Asimismo, se muestran en negrita los residuos coincidentes en ambos trabajos. El análisis del subtipo B*27:01 no se llevó a cabo en ninguno de los estudios de espectrometría de masas.

Por otra parte, la información que se extrae en los ensayos de estabilización de moléculas HLA es diferente de la que se consigue mediante los análisis por espectrometría de masas, ya que en estos se identifican los residuos más frecuentes en las distintas posiciones, mientras que los ensayos de estabilización discriminan los péptidos que pueden unirse, independientemente de que sus motivos de anclaje estén abundantemente representados o no. Además, la aproximación experimental utilizada en la presente tesis podría ser fácilmente aplicable a otras familias y supertipos de HLA de clase I cuyos motivos de anclaje aún no hayan sido determinados al detalle de subtipo, y podrían utilizarse para validar las herramientas bioinformáticas de predicción de ligandos y agrupamiento funcional de moléculas del MHC [242]. Asimismo, estos datos también serían relevantes para los estudios de identificación de respuestas de células T citotóxicas contra virus y en el desarrollo racional de vacunas.

3 PAPEL DEL GRADIENTE TRANSCRIPCIONAL DE LOS MONONEGAVIRALES EN LA INMUNOPREVALENCIA E INMUNODOMINANCIA DE LAS RESPUESTAS RESTRINGIDAS POR HLA DE CLASE I

A lo largo de los últimos años, mediante la lisis de células infectadas con HRSV proseguida de la inmunoprecipitación de los complejos péptido-HLA y posterior análisis por espectrometría de masas se han podido identificar en nuestro laboratorio un total de dieciséis ligandos de HRSV, provenientes de nueve de las once proteínas codificadas por el genoma viral, que eran procesados y presentados por cinco moléculas HLA de clase I distintas. De este modo, se han obtenido tres ligandos restringidos por HLA-A*02:01, dos por -B*07:02 y uno por C*07:01 además de los nueve ligandos restringidos por HLA-B*27:05 [194] y otro restringido por HLA-C*04:01 [198] (Tabla 10). A pesar de la importancia de los diferentes elementos de procesamiento y presentación de antígenos en la respuesta inmunológica frente a diferentes virus, aún se desconocen reglas generales que permitan describir cómo el sistema inmunológico selecciona ligandos de HLA de clase I en diferentes virus individuales y/o familias virales. Mediante el análisis de los dieciséis ligandos virales

citados, a lo largo de esta tesis se han estudiado distintos parámetros de la respuesta inmunológica celular frente a HRSV en un intento de determinar las reglas de procesamiento y presentación de antígenos en este virus, si es que existen. Los análisis realizados en la presente tesis no han permitido encontrar ninguna relación entre la naturaleza química o el número de ligandos detectados y el contenido en residuos utilizados como motivos de anclaje o el tamaño de las proteínas (Tabla 11 y Figura 40). Sin embargo, se pudo encontrar una llamativa relación entre los ligandos de HLA de clase I identificados con una de las características básicas de la biología de HRSV: la transcripción por la polimerasa viral que configura un gradiente en la expresión génica del virus.

Como ya se ha descrito en la introducción, los diez genes que forman parte del genoma de HRSV están dispuestos en el orden particular 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5' (Figura 8). La transcripción por la polimerasa viral del genoma de HRSV genera un gradiente en la síntesis de mRNA de modo que los genes más próximos al extremo 3' son más frecuentemente transcritos [106]. Así, al igual que en otros Mononegavirales, como resultado de este gradiente transcripcional los genes de HRSV se han dividido en tres grupos atendiendo al nivel de expresión de mRNA: grupo 3' de alta expresión de mRNA (NS1, NS2, N, P y M), grupo intermedio (SH, G, F, M2) y el grupo 5' de baja expresión de mRNA (L). Los resultados aquí expuestos describen que la mayoría de los dieciséis ligandos (un 75%) de HLA de clase I identificados provienen de proteínas codificadas por el grupo transcripcional 3', un 19% del grupo intermedio (IM) y sólo un 6% eran del grupo 5' (Figura 41). Esta relación 75:19:6 no concuerda con la que cabría esperar si los ligandos se distribuyeran al azar a lo largo del proteoma viral codificado por los diferentes grupos transcripcionales (relación 23:29:48), pero coincide con el que cabría esperar en base a la abundancia de proteína relativa medida a partir de la síntesis y expresión de mRNA (relación 82:19:6) (Figura 42). Por tanto, los grupos transcripcionales determinarían la inmunoprevalencia de los ligandos de HRSV asociados a las moléculas HLA de clase I.

Además, los ensayos funcionales de respuesta inmunológica *ex vivo* utilizando ratones transgénicos para tres moléculas HLA (HLA-A*02:01, B*07:02 y B*27:05) mostraron que los tres epítomos de HLA-A*02:01, dos de B*07:02 y seis de B*27:05 generaban secreción de IFN γ en células T (Figuras 44, 45 y 46). La distribución de estos epítomos atendiendo al grupo transcripcional al que pertenecen los genes que codifican para cada proteína se correlaciona con la distribución esperada teniendo en cuenta el gradiente de mRNA. Asimismo, la jerarquía en la respuesta global mediada por IFN γ también se explica por el gradiente transcripcional (Figura 47). Por el contrario, la respuesta específica de las células T CD8⁺ no se relacionaba ni con la afinidad de unión para las diferentes moléculas HLA (Figura 48A) ni existía una relación entre la afinidad de los ligandos y el grupo transcripcional (Figura 48B). Por tanto, el gradiente transcripcional también determina la inmunodominancia en las respuestas de células T restringidas por HLA de clase I frente a HRSV.

Los resultados expuestos en la presente memoria de tesis son consistentes con observaciones realizadas en el virus del sarampión, otro miembro de la familia *Paramyxoviridae*. Así, un ligando codificado en la proteína C, que forma parte del grupo transcripcional 3' del virus, era el inmunodominante, mientras que otros tres

ligandos, procedentes de la proteína M del grupo 3' o de las proteínas F y H del grupo intermedio, eran subdominantes [243]. En este estudio no se pudieron correlacionar estos datos con el gradiente en la transcripción debido probablemente al reducido número de epítomos estudiados. Sin embargo, los resultados de este trabajo, en conjunto con los datos expuestos en la presente memoria de tesis, indican que en la familia *Paramyxoviridae* la regulación transcripcional es la principal característica que limita y determina tanto la naturaleza como la jerarquía —la inmunoprevalencia y la inmunodominancia— de la respuesta de células T restringida por moléculas HLA de clase I.

Paralelamente, dos estudios previos que realizaban análisis bioinformáticos de ligandos procedentes de proteínas celulares endógenas hallaron que existía una mayor probabilidad de encontrar ligandos de HLA de clase I en aquellas proteínas codificadas por los mRNAs más abundantes, si bien algunos mRNAs poco transcritos también generaban una fracción considerable de ligandos [244,245]. Por el contrario, un estudio diferente, basado en el análisis de la expresión génica y la densidad de ligandos autólogos de HLA de aproximadamente trescientas proteínas, no logró hallar correlación alguna entre la expresión de mRNA y la abundancia de ligandos asociados a carcinoma renal [246].

Aunque la naturaleza e inmunodominancia de las respuestas de células T frente a epítomos particulares dependen de múltiples factores, algunos estudios subrayan la influencia de algunas características de los virus como es la expresión temporal de proteínas virales. Así, diferentes estudios han identificado reconocimiento específico de células T de antígenos tempranos, pero no tardíos, procedentes de tanto el virus de Epstein-Barr (EBV) [247] como de algunas cepas del virus vaccinia [248,249]. Sin embargo, aunque se ha hallado cierta correlación entre el comienzo de la expresión de proteínas con la presentación de epítomos del virus vaccinia, no se ha podido describir ninguna conexión entre la inmunodominancia y la abundancia de epítomos para este poxvirus [250].

En la presente tesis también se ha descrito una correlación entre el tamaño de las proteínas y el número de ligandos de HLA de clase I que derivan de ellas dentro del grupo transcripcional 3' de HRSV, donde la mayoría de la respuesta mediada por IFN γ se concentra contra epítomos de la proteína más grande, la nucleoproteína (Figura 49). Estos datos obtenidos en ratones del haplotipo H-2^b son consistentes con un trabajo anterior en el que se estimulaban células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos con HRSV *in vitro*, de tal manera que la nucleoproteína de HRSV era la proteína que se reconocía más eficientemente por las células T específicas de diferentes donantes [251]. En este sentido, los datos de este estudio junto los expuestos en la presente memoria de tesis indican que la nucleoproteína debería ser el principal inmunógeno que formara parte de un vector vacunal cuyo objetivo fuera estimular la respuesta por células T CD8⁺ frente a HRSV.

En resumen, el procesamiento y presentación de antígenos de epítomos de clase I procedentes de HRSV se modula jerárquicamente en dos niveles: en primer lugar, por la abundancia de las proteínas medidas como gradiente de transcripción del mRNA, y secundariamente, por el tamaño de las proteínas. Esta conclusión se podría confirmar mediante el estudio inmunológico de diferentes recombinantes de

HRSV en los cuales los distintos grupos transcripcionales del virus silvestre se intercambiasen (por ejemplo 5'-intermedio-3'). No obstante, esta aproximación experimental podría ser complicada puesto que está descrito que, pese a que el reordenamiento génico incrementa los niveles de mRNA de los genes próximos a 3', la eficiencia de replicación de los virus recombinantes a los que les ha reordenado el genoma en tan solo dos o tres genes individuales se ve seriamente afectada [252]. No obstante, existen recombinantes de *Parainfluenzavirus* —otro miembro de los Mononegavirales— donde el gen de la proteína de fusión de HRSV se ha insertado en diferentes posiciones a lo largo del genoma, por lo que sería un buen modelo para comprobar la importancia del gradiente transcripcional en la respuesta inmunológica frente a la proteína de fusión en los diferentes recombinantes virales [253].

Por otra parte, los resultados de esta tesis son relevantes en el diseño de vacunas frente a HRSV. En la actualidad, los inmunógenos que forman parte de los candidatos vacunales contra este virus que se encuentran en fases preclínicas y clínicas se centran en diferentes variantes de la proteína de fusión (sitio web de PATH [121]). Sin embargo, los datos expuestos en la presente memoria sugieren que esta proteína sería relativamente ineficaz en el desarrollo de respuestas mediadas por células T CD8⁺. En contraste, una construcción vacunal (virus recombinantes del tipo adenovirus o vaccinia, o por plásmidos de DNA) diseñada para estimular la respuesta citotóxica frente a HRSV debería estar formada preferentemente por proteínas cuyos genes formen parte del grupo transcripcional 3', ya que las proteínas codificadas por este grupo proporcionan el 75% de los ligandos de clase I y el 91% de la respuesta mediada por IFN γ mientras que las proteínas codificadas por el resto de grupos transcripcionales no son tan relevantes. Como el subproteoma derivado del grupo transcripcional 3' es relativamente grande (1.151 residuos de los 4.536 que conforman la cepa Long de HRSV), el vector vacunal podría incluir exclusivamente el gen de la nucleoproteína, la principal diana de la respuesta de clase I, y proteínas grandes codificadas dentro del grupo 3', como la proteína de la matriz. Como revelan los datos expuestos en esta tesis, sólo estas dos proteínas serían la fuente de la mitad de los ligandos de HLA de clase I presentados (8/16) y concentran más del 90% de la respuesta de IFN γ detectada. Por otra parte, pese a que los genes que las codifican forman parte del grupo 3' y se pudieran perder epítomos, la inclusión de las proteínas no estructurales 1 y 2 no sería recomendable debido a que son moléculas que en la infección natural por HRSV afectan a diversas proteínas de señalización celular e interfieren en las funciones de moléculas como los interferones de tipo I y III y de células del sistema inmunológico como células dendríticas y macrófagos.

Otro aspecto importante que se debería considerar en el diseño de vacunas contra HRSV es que en este virus existen dos subgrupos antigénicos, A y B. La mayoría de las proteínas de HRSV se encuentran altamente conservadas entre estos dos subgrupos (88-96% de coincidencia en aminoácidos), donde las mayores diferencias se registran entre las proteínas M2-2, G y SH que únicamente muestran un 61-71% de identidad entre subgrupos. Dentro de cada subgrupo, el porcentaje de coincidencia entre diferentes aislados virales es mucho mayor (97-100% de coincidencia) para todas las proteínas. Por tanto, sería razonable inferir un alto porcentaje de coincidencia entre los diferentes ligandos de HRSV restringidos por HLA de clase I entre las distintas cepas virales. Sin embargo, el análisis comparativo de secuencias

para estos ligandos entre la cepa Long, utilizada originalmente en los estudios de espectrometría de masas, y dos o tres cepas representativas de los grupos A y B determinó un número significativo de variantes peptídicas en cepas del subgrupo A respecto a la cepa Long (4 de 16, un 25%) (Tabla 15). Asimismo, 10 de estos ligandos (un 63%) también se encuentran alterados en las cepas del subgrupo B en relación con la cepa Long con la que se realizaron los estudios (Tabla 15). Además de las pruebas que indican que las células T CD8⁺ del tracto respiratorio se encuentran en parte funcionalmente inactivadas en ratones infectados por HRSV [254], la presentación de ligandos no conservados de HRSV podría ser un mecanismo relevante en la reinfección por diferentes variantes de HRSV o por cepas de diferentes subgrupos antigénicos [255]. Por ello, la construcción vacunal contra HRSV debería incorporar las proteínas relevantes de al menos alguna cepa viral representativa de cada subgrupo antigénico de HRSV con el objetivo de limitar la pérdida de reactividad cruzada entre cepas.

Tabla 15. Conservación de los ligandos de clase I de HRSV en varias cepas virales.

Cepa ^a	NS1 ₃₀₋₄₇ (A*02)	N ₃₁₅₋₃₂₃ (A*02)	F ₂₂₉₋₂₃₉ (A*02)	NS2 ₁₉₋₃₀ (B*07)	N ₃₀₆₋₃₁₄ (B*07)	M ₁₈₈₋₁₉₅ (C*04)	G ₂₅₋₃₃ (C*07)	NS2 ₃₇₋₄₅ (B*27)
Long	KLIHLTNAL	TQFPHFSSV	RLLEITREFSV	RPLSLETTITSL	NPKASLLSL	AITNAKII	FISSGLYKL	HRFIYLNH
S2	-----	-----	-----	-----I-I--	-----	-----	----C----	-----
A2	-----	-----	-----	-----I----	-----	-----	----C----	-K-----
9320	---L-----	---N-----	-----	---M-SI----	-----	-----	V---C---R-	-K-----N
18537	---L-----	---N-----	-----	---M-SI----	-----	ND ^b	V---C---R-	-K-----N
B1	---L-----	---N-----	---N-----	---MDSI----	-----	-----	V---C---R-	-K-----N

Cepa	N ₁₀₀₋₁₀₉ (B*27)	N ₁₈₄₋₁₉₄ (B*27)	N ₁₉₅₋₂₀₅ (B*27)	P ₁₉₈₋₂₀₈ (B*27)	M ₇₆₋₈₄ (B*27)	M ₁₆₉₋₁₇₇ (B*27)	M2-1 ₁₅₀₋₁₅₉ (B*27)	L ₂₀₈₉₋₂₀₉₇ (B*27)
Long	HRQDINGKEM	RRANNVLKNEM	KRYKGLLPKDI	LRNEESEKMAK	SRSALLAQM	VRNKDLNTL	KRLPADVLKK	GRNEVFSNK
S2	-----	-----	-----	-----	---V----	-----	-----	-----
A2	-----	-----	-----	-----	---V----	-----	-----	-----
9320	Y-----	-----	---I----	-----	---V----	-K-----S-	-----	-----
18537	Y-----	-----	---I----	-----	ND	ND	-----	-----
B1	Y-----	-----	---I----	-----	---V----	-K-----S-	-----	-----

^a Las cepas Long, S2 y A2 pertenecen al subgrupo antigénico A, mientras que 9320, 18537 y B1 son representativas del subgrupo B.

^b ND indica que la secuencia no se encuentra disponible en las bases de datos.

Finalmente, puesto que el mecanismo de gradiente transcripcional es prácticamente ubicuo dentro del orden Mononegavirales (con la notable excepción de la familia *Bornaviridae*), los datos presentados en esta memoria de tesis serían relevantes tanto en el análisis de la respuesta por CTLs como en el desarrollo de vacunas frente a otros miembros de este orden distintos de HRSV, si bien aún serían necesarios estudios confirmatorios adicionales utilizando otros miembros de los Mononegavirales (Figura 54). Así, los estudios inmunológicos de HLA de clase I deberían concentrarse sobre las proteínas inmunológicamente relevantes, es decir, las más grandes que estuviesen codificadas por genes de alta tasa de transcripción. Esta aproximación sería aplicable no sólo en la familia *Paramyxoviridae* sino en otras

del orden Mononegavirales como *Rhabdoviridae* y *Filoviridae*. Dicha estrategia sería muy relevante en la investigación de enfermedades altamente virulentas, como las provocadas por los virus del Ébola o de Marburgo, en las cuales se requiere un nivel de bioseguridad tipo IV para la manipulación de líneas celulares infectadas con los patógenos completos. Esta limitación se podría sortear mediante el uso de, por ejemplo, virus recombinantes inofensivos que codificaran para únicamente las proteínas del grupo transcripcional 3', de los cuales se extraería la información inmunológica más relevante.

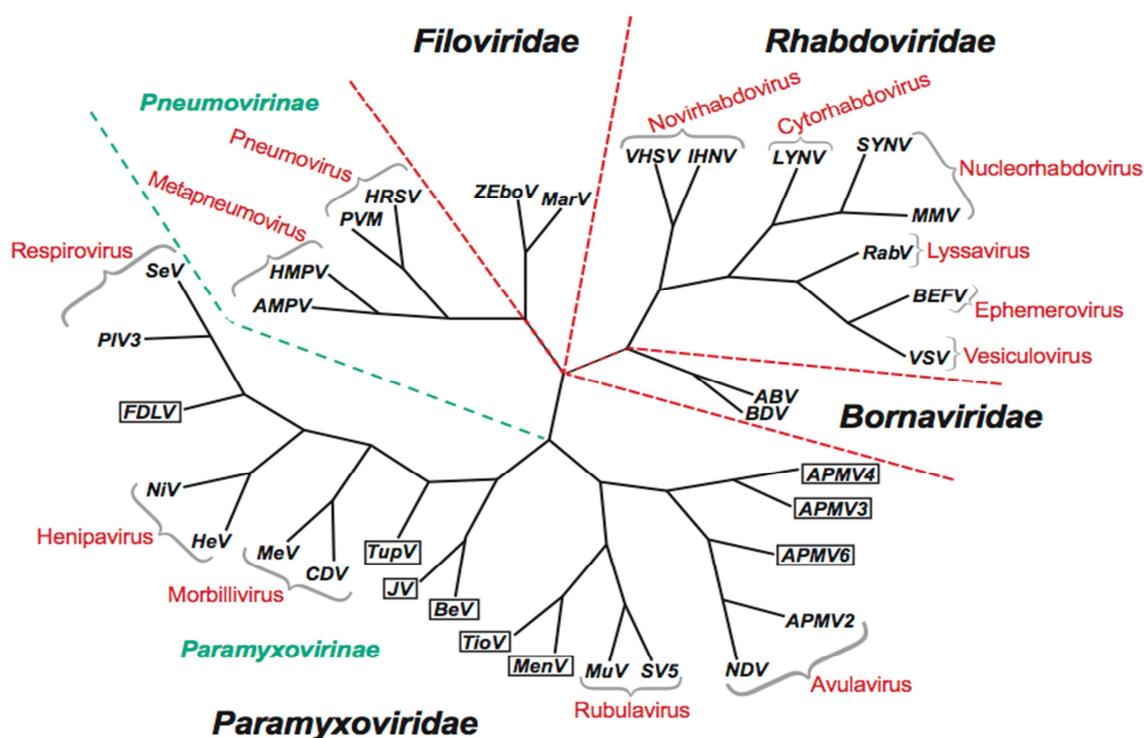


Figura 54. Árbol filogenético del orden Mononegavirales. El árbol representa las cuatro familias principales del orden Mononegavirales –*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y *Bornaviridae*– representadas en negrita. A su vez, en color verde se muestran las dos subfamilias de los *Paramyxoviridae* (*Pneumovirinae* y *Paramyxovirinae*) y en color rojo se señalan los distintos géneros. Los miembros de este orden poseen genomas formados por RNA de hebra sencilla y polaridad negativa. Con la excepción de la familia *Bornaviridae*, la expresión génica de los Mononegavirales se regula fundamentalmente por el mecanismo del gradiente transcripcional [107]. Figura procedente del Comité Internacional de Taxonomía de Virus [256].

4 MIMETISMO ANTIGÉNICO ENTRE LIGANDOS DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* Y UN LIGANDO ENDÓGENO HUMANO RESTRINGIDO POR HLA-B*27

En el contexto de la hipótesis del péptido artrítico, en estudios previos se había descrito el ligando endógeno B27³⁰⁹⁻³²⁰ (RRKSSGGKGGSY), un péptido proveniente de la cola citoplasmática de la propia molécula HLA-B*27 –y de todas las moléculas HLA del tipo B– que era presentado por los subtipos de HLA-B*27 asociados a la SpA (HLA-B*27:02, -B*27:04 y -B*27:05) pero que se encontraba ausente en los

protectores (HLA-B*27:06 y -B*27:09) [209]. Este péptido mostraba alta homología con varias secuencias procedentes de bacterias artríticas, en particular con la correspondiente a los residuos 211-222 de la proteína primasa de DNA (RRFKEGGRGGKY) de la bacteria artrítica *Chlamydia trachomatis*. Posteriores análisis de células HLA-B*27:05⁺ transfectadas con el gen para la primasa de DNA de *C. trachomatis* definieron dos ligandos bacterianos presentados por HLA-B*27 estrechamente relacionados con la secuencia artrítica predicha para esta bacteria. Estos dos péptidos diferían en longitud respecto al ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ en un residuo menos (DNAP₂₁₁₋₂₂₁) o más (DNAP₂₁₁₋₂₂₃) en el extremo C-terminal, si bien mantenían la alta homología de secuencia con el péptido endógeno. No obstante, se requerían estudios funcionales adicionales para explorar la respuesta frente a estos péptidos en el contexto de HLA-B*27 para confirmar el mimetismo antigénico propuesto.

Debido a que las infecciones por *C. trachomatis* muestran baja prevalencia y habitualmente son complicadas de diagnosticar, el acceso a muestras de pacientes HLA-B*27⁺ con SpA provocada por esta bacteria artrítica no es sencillo [257]. Por ello, los ensayos funcionales se llevaron a cabo utilizando una aproximación experimental con modelos murinos transgénicos para HLA-B*27:05 que consistía en la inoculación de péptidos sintéticos, puesto que la infección con *Chlamydia* de ratones de sexo masculino por vía natural es dificultosa [258]. Estos ratones, desarrollados por el grupo del Dr. Chella S. David de la Clínica Mayo, expresan eficientemente tanto las cadenas pesadas como la B2m de las moléculas HLA-B*27:05 [259]. Además, se ha descrito que estos animales desarrollan espontáneamente signos clínicos relacionados con la ReA como artritis, descoloración e hiperqueratosis en las uñas y, en los casos más graves, anquilosis de las patas traseras. Además, presentan cambios histológicos como la presencia de células mononucleares en las articulaciones y destrucción de cartilago [190]. La patología ocurre fundamentalmente en ratones de sexo masculino, los cuales desarrollan signos clínicos más graves que las artritis suaves que se registran en ratones de sexo femenino. Por otra parte, los síntomas aparecen exclusivamente cuando los animales son transferidos desde instalaciones libres de patógenos hacia animalarios convencionales en los que los animales quedan más expuestos a los diferentes microorganismos del ambiente. Esta particularidad apunta al probable papel patogénico de microorganismos artríticos que interaccionarían con los ratones una vez que estos se establecen en instalaciones sin barreras para patógenos. Cabe mencionar que estas dos características patogénicas de este modelo murino —diferencias por sexos y ausencia de síntomas en ambientes libres de patógenos— también son necesarias para la aparición de la enfermedad en ratas transgénicas para HLA-B*27:05 y ratones transgénicos para HLA-B*27:02 [260,261].

Los resultados expuestos en esta tesis doctoral muestran que las células T originadas en respuesta al tridecámero bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃, pero no en respuesta al undecámero DNAP₂₁₁₋₂₂₁, son capaces de reconocer de forma específica el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ (Figuras 50 y 51). Esta respuesta es específica de la molécula HLA-B*27:05 debido a la ausencia de reconocimiento específico de células T en ratones control que carecen de esta molécula HLA de clase I (Figura 52). La reactividad cruzada entre DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de *C. trachomatis* y el ligando endógeno B27

³⁰⁹⁻³²⁰, u otra similar, podría ser un importante factor en la patogénesis y/o evolución hacia una enfermedad crónica en la SpA en individuos HLA-B*27⁺.

Estas observaciones concuerdan con los resultados de modelización molecular de los tres péptidos restringidos por HLA-B*27:05 publicados anteriormente [208]. En ellos, el péptido bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ unido a HLA-B*27, aunque no DNAP₂₁₁₋₂₂₁, adoptaría conformaciones similares a las exhibidas por el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀. Por tanto, estos datos sugerían que la configuración del determinante antigénico para los CTLs sería similar tanto en los complejos de HLA-B*27:05 con el tridecámero bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ como con el péptido endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀, lo que daría lugar a la reactividad cruzada entre ambos péptidos (Figura 55). Los datos recogidos en este memoria muestran el mimetismo antigénico entre estos dos ligandos de la molécula HLA-B*27 y sugieren su posible implicación como componente autoinmunitario en el desarrollo de la SpA [262].

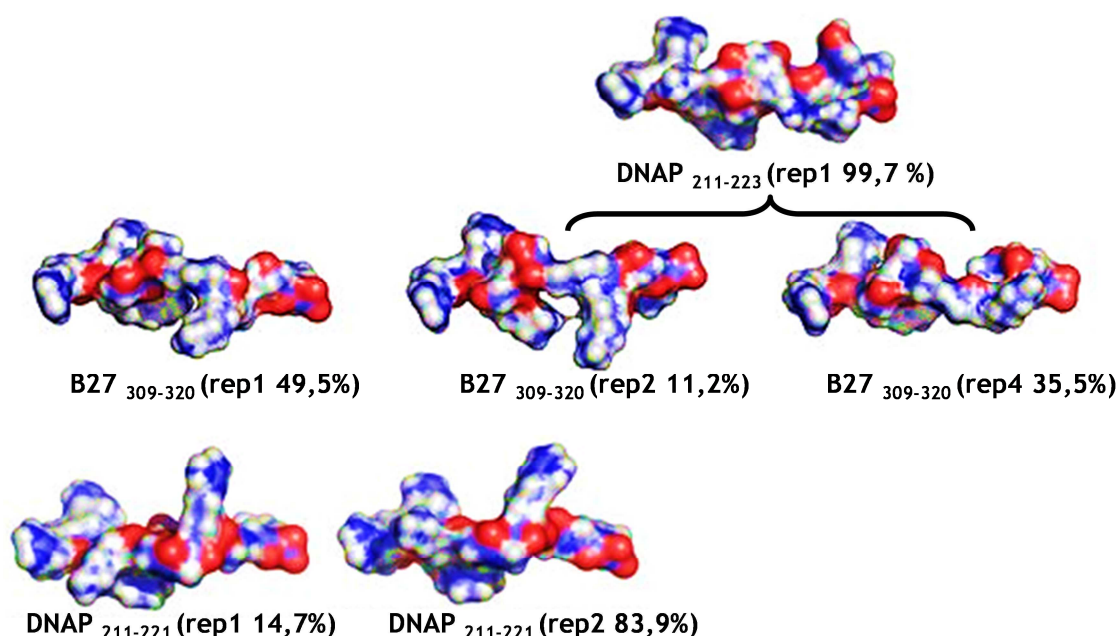


Figura 55. Modelización molecular del ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ y los bacterianos DNAP₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP₂₁₁₋₂₂₃. Se representan las conformaciones representativas (rep) obtenidas en varias repeticiones de simulaciones de dinámica molecular. Mientras que las dos conformaciones representativas de DNAP₂₁₁₋₂₂₁ eran muy diferentes a cualquiera de las tres correspondientes a B27₃₀₉₋₃₂₀, la mayoritaria y prácticamente única de DNAP₂₁₁₋₂₂₃ mostraba una estrecha similitud con el péptido endógeno, pues sería un intermedio entre la rep2 y la rep4 de dicho ligando. Figura modificada de Álvarez-Navarro *et al.* [208].

La ausencia de reactividad cruzada de las células T originadas contra DNAP₂₁₁₋₂₂₁ con el ligando endógeno es consistente con la disparidad conformacional predicha de los correspondientes complejos de péptido con HLA-B*27:05 (Figura 55). El hecho de que las células T generadas contra DNAP₂₁₁₋₂₂₃ mostraran reactividad cruzada tanto frente a su homólogo bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₁ como frente a B27₃₀₉₋₃₂₀ podría explicarse por dos poblaciones de células T distintas, una con reactividad cruzada por DNAP₂₁₁₋₂₂₁ (que se observaría también en los ratones inmunizados con DNAP₂₁₁₋₂₂₁) y

la otra con reactividad cruzada por B27₃₀₉₋₃₂₀. Alternativamente, es posible que DNAP₂₁₁₋₂₂₃ pudiera activar un mayor número de clones de células T capaces de reconocer los tres péptidos a la vez o que dichos clones se encuentren inicialmente en una considerable mayor proporción respecto a los que muestran reactividad cruzada entre DNAP₂₁₁₋₂₂₁ y DNAP₂₁₁₋₂₂₃ exclusivamente. Para responder a esta importante cuestión será necesario el desarrollo de líneas de CTLs específicas de los diferentes péptidos en las que se podría explorar el reconocimiento específico de una forma más minuciosa.

En la SpA se ha propuesto habitualmente que la expresión de las proteínas que dan lugar a los hipotéticos péptidos endógenos artrítogénicos debería ser específica de tejidos relacionados con las articulaciones, pues así se explicaría que la respuesta autoinmunitaria afecte mayoritariamente a estas regiones anatómicas. Dado que la expresión de la molécula HLA-B*27:05 es ubicua en todas las células nucleadas, el péptido B27₃₀₉₋₃₂₀ procedente de esta molécula de clase I no puede ser específico de tejido. No obstante, aun así podría seguir teniendo un papel relevante en la patogénesis de las SpAs. Por un lado, aunque en estas enfermedades el daño inflamatorio se concentra en las articulaciones, también se observan manifestaciones extra articulares que incluyen afecciones oculares (uveítis anterior), intestinales (enfermedad inflamatoria intestinal) y en la piel (psoriasis) y, en casos más excepcionales, trastornos cardiovasculares, pulmonares, renales y neurológicos [263,264]. Por tanto, el daño autoinmunitario afecta virtualmente a muchos de los órganos y tejidos del organismo.

Por otro lado, varios trabajos han demostrado la relevancia de antígenos ubicuos en otras enfermedades autoinmunitarias donde el daño se encuentra localizado en una o pocas regiones anatómicas. Así, en el proceso autoinmunitario de la artritis de Lyme se ha involucrado a la autorreactividad contra un péptido procedente de la molécula ubicua LFA1 que en pacientes muestra reactividad cruzada contra un epítipo procedente del agente causal de la enfermedad, *Borrelia burgdorferi* [265]. En modelos animales de artritis reumatoide se ha demostrado que, si bien no es necesario que se produzca reactividad cruzada con péptidos derivados de patógenos para desarrollar la enfermedad, ésta puede comenzar como consecuencia del reconocimiento por células T de autoantígenos provenientes de proteínas ubicuas como la glucosa-6-fosfato isomerasa [266] o la proteína ribosómica L23a [267]. Asimismo, también se ha descrito como un factor importante en la cirrosis biliar primaria la respuesta autorreactiva frente a ligandos derivados del componente E2 de los complejos piruvato deshidrogenasa por parte de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ [268,269]. Algunos factores que pueden influir en que la respuesta frente a un antígeno no específico de tejido se concentre en una o pocas regiones del organismo pueden ser el alojamiento específico (*homing*) de las células T autorreactivas en el órgano o tejido afectado o a la abundancia local de ciertas moléculas, como citoquinas activadoras, que generen un ambiente inflamatorio favorable para la activación de las células T autorreactivas. En este sentido, la expresión de IFN γ puede ser muy relevante, dado que esta citoquina estimula la presentación antigénica mediante el aumento de la expresión de HLA de clase I y, por tanto, de HLA-B*27:05 [64]. De este modo, se incrementarían las cantidades intracelulares de esta molécula (y de sus productos ribosomales defectuosos —DRiPs—

probablemente), facilitándose el procesamiento y presentación en superficie de los complejos de clase I con el autoantígeno B27₃₀₉₋₃₀₉, el cual sería reconocido por los CTLs autorreactivos que a su vez liberarían más IFN γ , generándose un proceso circular de retroalimentación positiva.

En las últimas décadas ha habido varios trabajos que han tratado de encontrar péptidos que pudieran considerarse artritogénicos de los que han surgido distintos candidatos. De este modo, la aproximación experimental utilizada en ciertos estudios consistió en la identificación de péptidos endógenos reconocidos únicamente en pacientes que padecen SpA, pero no por individuos HLA-B*27:05⁺ sanos, que posteriormente se intentaban relacionar con secuencias de patógenos. Aunque en ningún caso se ha definido reactividad cruzada con microorganismos artritogénicos, en estos trabajos se han hallado varios ligandos endógenos procedentes de proteínas ubicuas que mostraban homología de secuencia con bacterias artritogénicas [270] e incluso virus como EBV [271]. Asimismo, otro trabajo ha identificado reconocimiento específico de varios péptidos endógenos derivados de cartílago por parte de células T CD8⁺ restringidas por HLA-B*27:05, que podrían estar relacionados con la AS [272]. Paralelamente, la estrategia de otros estudios ha consistido, por el contrario, en buscar péptidos en bacterias consideradas artritogénicas que a continuación se comparaban con posibles secuencias derivadas de proteínas humanas. De esta forma, se han identificado péptidos restringidos por HLA-B*27:05 procedentes de *Salmonella* —una bacteria artritogénica— en pacientes con SpA [273]. También se han llevado a cabo intentos de identificar posibles péptidos de la propia bacteria *C. trachomatis* que pudieran estar implicados en la SpA [274]. Sin embargo, en todos los trabajos anteriormente mencionados continuaba sin identificarse mimetismo antigénico entre los péptidos derivados de patógenos y los ligandos humanos. Por ello, la reactividad cruzada detectada en la presente tesis entre el ligando bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ de *C. trachomatis* y el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ constituye la primera demostración de mimetismo molecular a nivel de célula T entre un epítipo restringido por HLA-B*27 procedente de una bacteria artritogénica y un ligando constitutivo humano derivado, en este caso, del procesamiento endógeno de la cadena pesada de HLA-B*27.

Por último, los datos expuestos obtenidos en ratones transgénicos para HLA-B*27:05 también han mostrado una interesante diferencia entre sexos ya que, en contraste con lo que ocurre en los ratones de sexo masculino, el reconocimiento específico del ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ por células T originadas frente a DNAP₂₁₁₋₂₂₃ es indetectable en los ratones de sexo femenino. Este resultado es coherente con el conocimiento acerca de la mayor frecuencia y peor pronóstico de la SpA en el sexo masculino, el cual se observa tanto en seres humanos como en los ratones y las ratas transgénicos para HLA-B*27:05 [81,190,260]. No obstante, el mecanismo subyacente que genera estas diferencias continúa sin explicación. Lo cierto es que las SpAs son la excepción dentro de las enfermedades autoinmunitarias, ya que este tipo de trastornos suelen ser considerablemente más frecuentes en el sexo femenino. En las últimas décadas se han identificado varios factores que contribuyen a las diferencias entre sexos del sistema inmunológico, habitualmente más robusto en el sexo femenino, que se encuentran implicados en la propensión a sufrir enfermedades autoinmunitarias [275]. De algún modo, en la SpA también podrían influir, aunque de modo distinto, algunas de estas características fisiológicas diferenciales que incluyen

factores genéticos y epigenéticos, efectos de hormonas sexuales y diferencias en el microbioma [276-278]. En este sentido, sería interesante realizar experimentos que analizaran el desarrollo de la enfermedad artrítica y de la respuesta frente a los ligandos descritos en la presente tesis en ratones HLA-B*27:05⁺ castrados o tratados con hormonas sexuales, tal y como se ha realizado en el modelo murino de esclerosis múltiple [279]. Igualmente, ya que cada vez existen más indicios de la implicación del microbioma en trastornos autoinmunitarios, también sería relevante llevar a cabo análisis que evaluaran la relación del microbioma de ambos sexos en el desarrollo de la enfermedad tanto en humanos como en modelos animales.

5 DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se ha llevado a cabo un estudio sobre el procesamiento y presentación de antígenos de ligandos de HLA de clase I, procedentes de virus (HCV y HRSV) y de bacterias (*Chlamydia trachomatis*), a varios niveles, que incluyen las propiedades biológicas de los patógenos, la restricción por las moléculas presentadoras y el reconocimiento específico por los linfocitos T CD8⁺. De esta forma, se han establecido relaciones con importancia para la comprensión de las enfermedades infecciosas virales como las provocadas por HCV y HRSV y la respuesta inmunológica frente a ellas, y se han extraído conclusiones relevantes en el desarrollo racional de vacunas, en la elaboración y análisis de bases de datos y en la patogénesis de las espondiloartropatías.

En primer lugar, los resultados expuestos en la presente tesis en conjunto tienen importantes implicaciones en el diseño de vacunas poliepitópicas, es decir, formulaciones donde varios epítomos de células T son incluidos en una misma construcción vacunal artificial, las cuales ya se están comprobando frente a virus como HIV y EBV, parásitos como *Plasmodium* y *Leishmania*, y ciertos cánceres [280,281]. Por un lado, los datos llaman la atención sobre el hecho de que generalmente se ha ignorado el efecto del polimorfismo de los diferentes alelos de HLA en la descripción de los ligandos y epítomos. Así, a la hora de desarrollar vacunas para estimular la respuesta por células T CD8⁺ deberían incluirse epítomos que garantizaran la unión y presentación por los subtipos de HLA de clase I presentes en la población a la cual se desee inmunizar. Estas formulaciones vacunales deberían diseñarse independientemente de cuales sean los alelos más comunes en la población humana en su conjunto, o cuales hayan sido tradicionalmente los más utilizados y se consideren prototípicos. Un hecho importante es que muchos de los patógenos que provocan las enfermedades infecciosas de mayor tasa de morbilidad y mortalidad son comunes en zonas tropicales y ecuatoriales. Sin embargo, la diversidad y composición de alelos de HLA de clase I no se encuentra bien estudiada en las poblaciones afectadas por estas enfermedades ya que los análisis de haplotipos para HLA, que se realizan fundamentalmente para evaluar la compatibilidad en trasplantes de órganos, se han llevado a cabo principalmente en países desarrollados. Por eso, las futuras vacunas que traten de optimizar la respuesta por células T CD8⁺ contra patógenos comunes en latitudes bajas, que incluyen virus que provocan fiebres hemorrágicas

(virus del Ébola, Chikungunya, Lassa...) y parásitos (como *Plasmodium*, el agente causal de la malaria), deberán tener en cuenta las peculiaridades en la distribución de los subtipos de HLA de clase I, especialmente en las poblaciones y etnias afectadas.

Una alternativa posible a la realización de caracterizaciones tan exhaustivas de los alelos de HLA dentro de cada población es, como se ha descrito en la presente memoria, la definición de reglas de presentación antigénica comunes cada familia de HLA de clase I. Esto permitiría fijar un criterio de selección para péptidos o ligandos dentro de un conjunto de candidatos para formar parte de inmunógenos terapéuticos. Así, aquellos péptidos que satisficieran los motivos de anclaje comunes para la mayoría de subtipos de una familia HLA serían, *a priori*, los más indicados para formar parte de una formulación vacunal pues permitirían la presentación por prácticamente todos los miembros de un grupo alélico en particular. De este modo se sorteaba el inconveniente que suponen las diferencias en la unión a distintos subtipos que conllevan a divergencias en la respuesta frente a epítomos en diferentes individuos.

En el caso del orden Mononegavirales, se han diseñado agentes vacunales eficaces contra distintos géneros de este grupo de virus. De este modo, existen vacunas contra virus que infectan a humanos, como es el caso del virus de la rabia por un lado, y de los virus del sarampión y de las paperas por otro (en cuyos casos se utiliza la misma preparación vacunal, la denominada vacuna triple vírica). Las vacunas contra estos patógenos consisten en virus atenuados o inactivados. Debido ello, por motivos de seguridad farmacológica y posibles efectos secundarios, algunos organismos y autoridades sanitarias como la Organización Mundial de la Salud no aconsejan su aplicación en ciertos casos y recomiendan buscar alternativas, como vacunas de subunidades, poliepitópicas o de DNA, donde no se dan problemas de reversión y los efectos secundarios son menos frecuentes y graves. También se han desarrollado vacunas de importante valor económico, pues previenen de la infección en animales domésticos por miembros de los Mononegavirales como son los virus que provocan el moquillo en diversos mamíferos o la enfermedad de Newcastle en aves. Sin embargo, existen virus pertenecientes a este orden en los que, pese a la alta prevalencia, morbilidad y mortalidad que provoca la enfermedad asociada, no existe vacuna efectiva para su control y prevención. El caso de HRSV es quizá el más llamativo puesto que aunque se ha estado trabajando en el desarrollo de un agente vacunal durante más de cincuenta años, los progresos han sido más bien moderados. Además, dentro de los Mononegavirales existen géneros altamente virulentos, como son los del virus del Ébola y Marburgo que se enmarcan en la familia *Filoviridae*, que se consideran una amenaza de primer orden y para los que sin embargo no existe vacuna ni tratamiento profiláctico alguno. Por ello, el desarrollo de agentes vacunales contra este tipo de virus es un objetivo prioritario. Los resultados mostrados en la presente memoria describen un patrón de reconocimiento por parte de las células T CD8⁺, basado en la transcripción diferencial de los genes virales, que permite establecer dos importantes reglas para el diseño de vectores vacunales que estimulen la respuesta citotóxica frente a estos virus. En primer lugar, las proteínas cuyos genes se encuentren más cercanos al promotor 3' serán los candidatos más atractivos para incluir en una vacuna, pues probablemente darán lugar a un mayor

número de epítomos que las proteínas cuyos genes posean una menor tasa de transcripción. La segunda regla sería que, dentro de las proteínas más próximas al promotor 3', es preferible elegir proteínas grandes, pues es más probable que su secuencia albergue diferentes epítomos. Estas dos simples directrices pueden simplificar considerablemente la investigación, evaluación y desarrollo de futuras vacunas frente a los diferentes miembros de los Mononegavirales.

Respecto al diseño de vacunas, en trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio se ha determinado que, en contraste con lo observado para clase I, la respuesta restringida por moléculas HLA de clase II no se encuentra limitada por el gradiente transcripcional puesto que de los diecinueve ligandos de HLA-DR identificados, la mayoría pertenecen a la proteína de fusión, si bien algunos forman parte de la proteína no estructural 1 y de la matriz [282]. Por tanto, en conjunto con los datos extraídos de los ligandos de HLA de clase I, se puede proponer que el vector vacunal más apropiado para generar respuestas inmunológicas generales contra HRSV consistiría en uno formado por proteínas codificadas por el grupo transcripcional 3' (fundamentalmente la nucleoproteína y la proteína de la matriz) para estimular el reconocimiento por células T CD8⁺, y por la proteína de fusión, ya que es una importante fuente de epítomos de clase II así como una de las dianas principales para la respuesta por anticuerpos [283].

Por otra parte, los resultados recogidos en la presente memoria tienen importantes implicaciones en los análisis bioinformáticos de las bases de datos de epítomos. Aunque existen trabajos que identifican la distribución de epítomos para células T CD8⁺ entre las diferentes proteínas de HCV [284] e incluso de HRSV [285], los metaanálisis de este tipo exigen cierta cautela puesto que en las bases de datos un gran número de epítomos restringidos por moléculas del MHC de clase I provienen de estudios que se han centrado en proteínas codificadas por mRNAs de abundancia intermedia-baja (como la proteína de fusión en el caso de HRSV) y, por tanto, su relevancia podría ser marginal en la respuesta natural mediada por clase I. Por ello, los análisis bioinformáticos de la distribución de los epítomos virales que se realicen utilizando estas bases de datos pueden enmascarar la contribución real de las diferentes proteínas virales en las respuestas de células T. Por el contrario, este tipo de metaanálisis únicamente deberían considerar trabajos en los que se hayan utilizado virus completos y, por tanto, no se hayan introducido preferencias hacia ninguna proteína viral particular. En estos casos, la evaluación de los diferentes epítomos permitiría componer una imagen real de cómo se comporta el sistema inmunológico frente a ciertas infecciones y qué patrones pueden existir en la inmunodominancia.

Otra implicación respecto a las bases de datos es debida a que en muchas de ellas la definición de los elementos de restricción para los epítomos y ligandos únicamente llega al nivel de familia HLA. Como se ha demostrado en HCV, la resolución a nivel de subtipo es muy relevante puesto que el reconocimiento de algunos epítomos, por inmunodominantes que sean, puede variar significativamente en función de las moléculas presentadoras en particular. En este sentido, en la composición de las bases de datos y en los análisis realizados a partir de ellas sería importante considerar el polimorfismo en el sistema del MHC a todos los niveles.

Asimismo, los programas de búsqueda y predicción se pueden beneficiar de los resultados mostrados en esta tesis, pues sus algoritmos pueden encontrarse parcialmente sesgados por la composición y número de datos de partida. Un ejemplo es el caso de HLA-B*27, familia para la cual la mayoría de algoritmos utilizan los datos de secuencias extraídas por degradación de Edman o espectrometría de masas cuyas predicciones no son siempre certeras. De este modo, existen péptidos que obtienen puntuaciones moderadas o bajas de afinidad que no obstante muestran alta afinidad de unión por una molécula HLA de clase I particular. Y al contrario, ligandos predichos con alta fiabilidad estadística finalmente pueden no unirse con la suficiente estabilidad a la molécula presentadora. Por otra parte, los algoritmos de predicción de epítomos de HLA de clase I, en el caso de los Mononegavirales, podrían aprovecharse de las nociones sobre la respuesta mediada por clase I y ponderar la relevancia de cada ligando en función del grupo transcripcional del cual provenga el gen que codifica para su proteína.

Por último, los datos recogidos en la presente memoria abren una nueva ventana hacia la comprensión de las SpAs. Sea o no un verdadero péptido artrítogénico capaz de iniciar el daño autoinmunitario, la reactividad cruzada detectada en el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ frente al péptido de *C. trachomatis* DNAP₂₁₁₋₂₂₃ puede ser muy relevante en el conocimiento de la patogénesis de estas enfermedades. Para analizar la verdadera naturaleza del mimetismo antigénico entre estos dos péptidos será necesario la revisión de un número suficiente de pacientes con HLA-B*27, lo cual no es una tarea sencilla dada la baja frecuencia de pacientes HLA-B27⁺ infectados con *C. trachomatis* que padecen alguna SpA. Por otra parte, los datos de esta memoria permiten inferir que quizá puedan existir casos de reactividad cruzada entre ligandos endógenos y epítomos de bacterias artrítogénicas (no solo de *Chlamydia*, sino de otras como los patógenos de infección gastrointestinal como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*...), por lo que las futuras investigaciones deberían desarrollarse en este sentido.

IX. CONCLUSIONES

1. La capacidad de unión del epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ de HCV a HLA-B*27:02 y -B*27:05 determina el reconocimiento diferencial en pacientes infectados con el virus.
2. La sustitución de arginina por lisina en la posición 2 del epítipo NS5B₄₀₃₋₄₁₁ constituye una mutación de escape viral que impide la unión efectiva a la molécula HLA-B*27:02.
3. La afinidad de unión de los epítopos NS5B₄₀₃₋₄₁₁, NS5B₄₂₄₋₄₃₂ y NS5B₅₁₉₋₅₂₆ a los diferentes subtipos de HLA-B*27 sugiere variaciones en la inmunodominancia en pacientes HLA-B*27:04⁺ y B*27:06⁺.
4. La estructura Arg/Lys-Arg-X_n-Ile/Leu/Met constituye un motivo de anclaje mínimo común para la unión efectiva a siete subtipos de HLA-B*27 distintos funcional y geográficamente.
5. El gradiente en la transcripción de los genes de HRSV determina la inmunoprevalencia de los ligandos presentados por HLA de clase I.
6. El gradiente en la transcripción de los genes de HRSV determina la inmunodominancia de la respuesta mediada por HLA de clase I.
7. El tamaño de las proteínas codificadas por los genes del grupo transcripcional 3' de HRSV determina la inmunoprevalencia e inmunodominancia dentro de este grupo.
8. El péptido de *Chlamydia trachomatis* DNAP₂₁₁₋₂₂₃ muestra reactividad cruzada por el ligando endógeno humano B27₃₀₉₋₃₂₀ en el contexto de HLA-B*27:05, siendo el primer caso descrito de mimetismo antigénico entre un ligando bacteriano y un péptido endógeno.
9. La reactividad cruzada entre el epítipo bacteriano DNAP₂₁₁₋₂₂₃ y el ligando endógeno B27₃₀₉₋₃₂₀ se produce exclusivamente en ratones del sexo masculino, el cual presenta una patología más frecuente y severa tanto en seres humanos como en modelos murinos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Leung, S. et al. 2010. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol.Immunol.* 7:182.
2. Davis, M. M. et al. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:523.
3. Orr, H. T. et al. 1979. Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry* 18:5711.
4. Belyakov, I. M. et al. 2007. Role of alpha3 domain of class I MHC molecules in the activation of high- and low-avidity CD8+ CTLs. *Int.Immunol.* 19:1413.
5. Bjorkman, P. J. et al. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506.
6. Ljunggren, H. G. et al. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476.
7. Garrett, T. P. et al. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342:692.
8. Matsumura, M. et al. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927.
9. Hughes, A. L. et al. 1995. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 42:233.
10. Robinson, J. et al. 2015. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 43:D423-D431.
11. Bjorkman, P. J. et al. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512.
12. Teng, M. K. et al. 1998. Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes. *Curr.Biol.* 8:409.
13. Falk, K. et al. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290.
14. Neefjes, J. et al. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat.Rev.Immunol.* 11:823.
15. Rock, K. L. et al. 2016. Present yourself! By MHC class I and MHC class II molecules. *Trends Immunol.* 37:724.
16. Mester, G. et al. 2011. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol.Life Sci.* 68:1521.
17. Yewdell, J. W. 2011. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol.* 32:548.
18. Rock, K. L. et al. 2014. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol.* 35:144.
19. Michalek, M. T. et al. 1993. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363:552.

20. Rock, K. L. et al. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761.
21. Sijts, E. J. et al. 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol.Life Sci.* 68:1491.
22. Inobe, T. et al. 2014. Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 24:156.
23. Kisselev, A. F. et al. 1999. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes - Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J.Biol.Chem.* 274:3363.
24. Eggensperger, S. et al. 2015. The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biol.Chem.* 396:1059.
25. Vos, J. C. et al. 1999. Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J.Immunol.* 163:6679.
26. van Endert, P. M. et al. 1994. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity.* 1:491.
27. Koopmann, J. O. et al. 1996. Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur.J.Immunol.* 26:1720.
28. Momburg, F. et al. 1994. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367:648.
29. Neefjes, J. et al. 1995. Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur.J.Immunol.* 25:1133.
30. Verweij, M. C. et al. 2015. Viral inhibition of the transporter associated with antigen processing (TAP): a striking example of functional convergent evolution. *PLoS.Pathog.* 11:e1004743.
31. Lankat-Buttgereit, B. et al. 2002. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol.Rev.* 82:187.
32. Wearsch, P. A. et al. 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr.Opin.Cell Biol.* 20:624.
33. Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol.Immunol.* 39:697.
34. Hulpke, S. et al. 2013. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem.Sci.* 38:412.
35. Gao, B. et al. 2002. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 16:99.
36. Garbi, N. et al. 2006. Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat.Immunol.* 7:93.
37. Zhang, Y. et al. 2006. Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules. *J.Biol.Chem.* 281:14622.

38. Park, B. et al. 2006. Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* 127:369.
39. Wearsch, P. A. et al. 2007. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat.Immunol.* 8:873.
40. Garstka, M. A. et al. 2015. The first step of peptide selection in antigen presentation by MHC class I molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 112:1505.
41. Praveen, P. V. et al. 2010. Tapasin edits peptides on MHC class I molecules by accelerating peptide exchange. *Eur.J.Immunol.* 40:214.
42. Hermann, C. et al. 2015. TAPBPR alters MHC class I peptide presentation by functioning as a peptide exchange catalyst. *Elife.* 4.
43. Morozov, G. I. et al. 2016. Interaction of TAPBPR, a tapasin homolog, with MHC-I molecules promotes peptide editing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 113:E1006-E1015.
44. Weimershaus, M. et al. 2013. Peptidases trimming MHC class I ligands. *Curr.Opin.Immunol.* 25:90.
45. Lázaro, S. et al. 2015. Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome. *Mol.Immunol.* 68:72.
46. Serwold, T. et al. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480.
47. Saric, T. et al. 2002. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat.Immunol.* 3:1169.
48. Saveanu, L. et al. 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat.Immunol.* 6:689.
49. Kanaseki, T. et al. 2013. ERAAP and tapasin independently edit the amino and carboxyl termini of MHC class I peptides. *J.Immunol.* 191:1547.
50. Chen, H. et al. 2016. ERAP1-ERAP2 dimers trim MHC I-bound precursor peptides; implications for understanding peptide editing. *Sci.Rep.* 6:28902.
51. Schumacher, T. N. et al. 1990. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 62:563.
52. Saunders, P. M. et al. 2011. Running the gauntlet: from peptide generation to antigen presentation by MHC class I. *Tissue Antigens* 78:161.
53. Xing, Y. et al. 2012. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 4.
54. Klenerman, P. et al. 2005. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat.Immunol.* 6:873.
55. Gattinoni, L. et al. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat.Rev.Cancer* 12:671.
56. Prlic, M. et al. 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr.Opin.Immunol.* 19:315.

57. Kulinski, J. M. et al. 2013. Regulation of antiviral CD8 T-cell responses. *Crit.Rev.Immunol.* 33:477.
58. Reinherz, E. L. et al. 2015. Codification of bidentate pMHC interaction with TCR and its co-receptor. *Trends Immunol.* 36:300.
59. Chen, L. et al. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat.Rev.Immunol.* 13:227.
60. Duttagupta, P. A. et al. 2009. Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. *Crit.Rev.Immunol.* 29:469.
61. Pearce, E. L. et al. 2007. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J.Immunol.* 179:2074.
62. Malek, T. R. et al. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity.* 33:153.
63. Steimle, V. et al. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.
64. Zhou, F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int.Rev.Immunol.* 28:239.
65. Schoenborn, J. R. et al. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv.Immunol.* 96:41.
66. de Saint, B. G. et al. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat.Rev.Immunol.* 10:568.
67. Pipkin, M. E. et al. 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr.Opin.Immunol.* 19:301.
68. Chávez-Galán, L. et al. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol.Immunol.* 6:15.
69. Brewerton, D. A. et al. 1973. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1:904.
70. Sheehan, N. J. 2004. The ramifications of HLA-B27. *J.R.Soc.Med.* 97:10.
71. Blanco-Gelaz, M. A. et al. 2001. Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27. *Hum.Immunol.* 62:1042.
72. Ben Dror, L. et al. 2010. The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum.* 62:420.
73. Infantes, S. et al. 2013. Natural HLA-B*2705 protein ligands with glutamine as anchor motif: implications for HLA-B27 association with spondyloarthropathy. *J.Biol.Chem.* 288:10882.
74. Lamas, J. R. et al. 1999. Modulation at multiple anchor positions of the peptide specificity of HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 42:1975.
75. López de Castro, J. A. et al. 2004. HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* 63:424.
76. Mathieu, A. et al. 2009. The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: a unifying hypothesis. *Autoimmun.Rev.* 8:420.

77. Zochling, J. et al. 2005. The current concept of spondyloarthritis with special emphasis on undifferentiated spondyloarthritis. *Rheumatology.(Oxford)* 44:1483.
78. Ehrenfeld, M. 2012. Spondyloarthropathies. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 26:135.
79. Brown, M. A. et al. 1996. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the united Kingdom. *Ann.Rheum.Dis.* 55:268.
80. Bowness, P. 2015. HLA-B27. *Annu.Rev.Immunol.* 33:29.
81. Zochling, J. et al. 2010. Seronegative spondyloarthritis. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 24:747.
82. Brewerton, D. A. et al. 1973. Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet* 302:996.
83. Colmegna, I. et al. 2004. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. *Clin.Microbiol.Rev.* 17:348.
84. Tam, L. S. et al. 2010. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat.Rev.Rheumatol.* 6:399.
85. Turner, M. J. et al. 2007. HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease. *Arthritis Rheum.* 56:215.
86. Chan, A. T. et al. 2005. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 52:3586.
87. Ramos, M. et al. 2002. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens.* 60:191.
88. Peipert, J. F. 2003. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N.Engl.J.Med.* 349:2424.
89. Zeidler, H. et al. 2014. New insights into Chlamydia and arthritis. Promise of a cure? *Ann.Rheum.Dis.* 73:637.
90. Elwell, C. et al. 2016. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat.Rev.Microbiol.* 14:385.
91. Hackstadt, T. et al. 1997. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.* 5:288.
92. Brunham, R. C. et al. 2005. Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat.Rev.Immunol.* 5:149.
93. Gerard, H. C. et al. 2001. Expression of Chlamydia trachomatis genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol.Microbiol.* 41:731.
94. Belland, R. J. et al. 2003. Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:15971.
95. Bachmaier, K. et al. 1999. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 283:1335.

96. Popov, I. et al. 2002. Breakdown of CTL tolerance to self HLA-B*2705 induced by exposure to *Chlamydia trachomatis*. *J.Immunol.* 169:4033.
97. Loomis, W. P. et al. 2002. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:87.
98. Morrison, S. G. et al. 2000. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect.Immun.* 68:6979.
99. Schumacher, H. R., Jr. et al. 1988. Light and electron microscopic studies on the synovial membrane in Reiter's syndrome. Immunocytochemical identification of chlamydial antigen in patients with early disease. *Arthritis Rheum.* 31:937.
100. Fauquet, C. M. et al. 2005. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.
101. Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol.Rev.* 35:235.
102. Collins, P. L. et al. 2013. Respiratory Syncytial Virus. In *Fields Virology*. pp. 1086-1124.
103. Cowton, V. M. et al. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J.Gen.Virol.* 87:1805.
104. Iverson, L. E. et al. 1981. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23:477.
105. Collins, P. L. et al. 1983. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:3208.
106. Barik, S. 1992. Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *J.Virol.* 66:6813.
107. Wertz, G. W. et al. 1998. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:3501.
108. Hall, C. B. 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N.Engl.J.Med.* 344:1917.
109. Shay, D. K. et al. 2001. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J.Infect.Dis.* 183:16.
110. Han, L. L. et al. 1999. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J.Infect.Dis.* 179:25.
111. Falsey, A. R. et al. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N.Engl.J.Med.* 352:1749.
112. Wendt, C. H. et al. 1995. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections in the immunocompromised host. *Semin.Respir.Infect.* 10:224.
113. Ison, M. G. et al. 2002. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr.Opin.Infect.Dis.* 15:355.
114. Henderson, F. W. et al. 1979. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N.Engl.J.Med.* 300:530.

115. Nair, H. et al. 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375:1545.
116. Lozano, R. et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2095.
117. Wu, H. et al. 2008. Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 317:103.
118. Acosta, P. L. et al. 2015. Brief history and characterization of enhanced respiratory syncytial virus disease. *Clin.Vaccine Immunol.* 23:189.
119. De, G. E. et al. 2014. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat.Rev.Immunol.* 14:505.
120. Guvenel, A. K. et al. 2014. Current concepts and progress in RSV vaccine development. *Expert.Rev.Vaccines.* 13:333.
121. PATH's vaccine resource library. 2016. RSV vaccine snapshot. Available from: <http://www.path.org/vaccineresources/details.php?i=1562>.
122. Russell, C. D. et al. 2017. The human immune response to respiratory syncytial virus infection. *Clin.Microbiol.Rev.* 30:481.
123. Walsh, E. E. et al. 2004. Humoral and mucosal immunity in protection from natural respiratory syncytial virus infection in adults. *J.Infect.Dis.* 190:373.
124. Bagga, B. et al. 2015. Effect of preexisting serum and mucosal antibody on experimental respiratory syncytial virus (RSV) challenge and infection of adults. *J.Infect.Dis.* 212:1719.
125. Hall, C. B. et al. 1986. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N.Engl.J.Med.* 315:77.
126. Openshaw, P. J. et al. 2013. Protective and dysregulated T cell immunity in RSV infection. *Curr.Opin.Virol.* 3:468.
127. Graham, B. S. et al. 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J.Clin.Invest.* 88:1026.
128. Christiaansen, A. F. et al. 2014. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol.Res.* 59:109.
129. Heidema, J. et al. 2007. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *J.Immunol.* 179:8410.
130. Rossey, I. et al. 2014. CD8+ T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine* 32:6130.
131. Brandenburg, A. H. et al. 2000. HLA class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J.Virol.* 74:10240.
132. Rock, M. T. et al. 2003. Identification of a novel human leucocyte antigen-A*01-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in the respiratory syncytial virus fusion protein. *Immunology* 108:474.

133. Venter, M. et al. 2003. Respiratory syncytial virus nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell epitopes in a South African population of diverse HLA types are conserved in circulating field strains. *J.Virol.* 77:7319.
134. Heidema, J. et al. 2004. Human CD8(+) T cell responses against five newly identified respiratory syncytial virus-derived epitopes. *J.Gen.Virol.* 85:2365.
135. Terrosi, C. et al. 2007. Immunological characterization of respiratory syncytial virus N protein epitopes recognized by human cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol.* 20:399.
136. Meiring, H. D. et al. 2006. Stable isotope tagging of epitopes: a highly selective strategy for the identification of major histocompatibility complex class I-associated peptides induced upon viral infection. *Mol.Cell Proteomics.* 5:902.
137. Ray, S. C. et al. 2013. Hepatitis C Virus. In *Fields Virology*. pp. 795-824.
138. Ding, Q. et al. 2014. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. *Cell Host.Microbe* 16:562.
139. Romero-Brey, I. et al. 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS.Pathog.* 8:e1003056.
140. Meyers, N. L. et al. 2016. Entangled in a membranous web: ER and lipid droplet reorganization during hepatitis C virus infection. *Curr.Opin.Cell Biol.* 41:117.
141. Scheel, T. K. et al. 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat.Med.* 19:837.
142. Lavanchy, D. 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 29 Suppl 1:74.
143. Thrift, A. P. et al. 2017. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 14:122.
144. Cox, A. L. et al. 2005. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin.Infect.Dis.* 40:951.
145. Jacobson, I. M. et al. 2010. Prevalence and challenges of liver diseases in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 8:924.
146. Powdrill, M. H. et al. 2010. Inhibitors of the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase NS5B. *Viruses.* 2:2169.
147. Kuiken, C. et al. 2009. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol.Biol.* 510:33.
148. Cento, V. et al. 2012. HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS.ONE.* 7:e39652.
149. Pierce, B. G. et al. 2016. Viral evasion and challenges of hepatitis C virus vaccine development. *Curr.Opin.Virol.* 20:55.
150. Heim, M. H. 2013. Innate immunity and HCV. *J.Hepatol.* 58:564.
151. Thimme, R. et al. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J.Exp.Med.* 194:1395.
152. Walker, C. M. 2010. Adaptive immunity to the hepatitis C virus. *Adv.Virus Res.* 78:43.

153. Semmo, N. et al. 2006. Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood* 107:4570.
154. Jacobson Brown, P. M. et al. 2001. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin.Biochem.* 34:167.
155. Grakoui, A. et al. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659.
156. Shoukry, N. H. et al. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J.Exp.Med.* 197:1645.
157. Rehmann, B. 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J.Clin.Invest.* 119:1745.
158. Rehmann, B. et al. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat.Rev.Immunol.* 5:215.
159. McKiernan, S. M. et al. 2004. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 40:108.
160. Kuniholm, M. H. et al. 2010. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology* 51:1514.
161. Fitzmaurice, K. et al. 2015. Additive effects of HLA alleles and innate immune genes determine viral outcome in HCV infection. *Gut* 64:813.
162. Kim, A. Y. et al. 2011. Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B 57 and preservation of targeted epitopes. *Gastroenterology* 140:686.
163. Neumann-Haefelin, C. 2013. HLA-B27-mediated protection in HIV and hepatitis C virus infection and pathogenesis in spondyloarthritis: two sides of the same coin? *Curr.Opin.Rheumatol.* 25:426.
164. Klenerman, P. et al. 2012. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut* 61:1226.
165. Blackburn, S. D. et al. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat.Immunol.* 10:29.
166. Petrovic, D. et al. 2012. Hepatitis C virus-T-cell responses and viral escape mutations. *Eur.J.Immunol.* 42:17.
167. Fuller, M. J. et al. 2010. Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology* 51:378.
168. Neumann-Haefelin, C. et al. 2006. Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* 43:563.
169. Neumann-Haefelin, C. et al. 2011. Human leukocyte antigen B27 selects for rare escape mutations that significantly impair hepatitis C virus replication and require compensatory mutations. *Hepatology* 54:1157.
170. Ljunggren, H. G. et al. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J.Exp.Med.* 162:1745.
171. García, F. et al. 1997. HLA-B27 (B*2701) specificity for peptides lacking Arg2 is determined by polymorphism outside the B pocket. *Tissue Antigens* 49:580.

172. Paradela, A. et al. 1998. The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J.Immunol.* 161:5481.
173. Galocha, B. et al. 1996. Binding of peptides naturally presented by HLA-B27 to the differentially disease-associated B*2704 and B*2706 subtypes, and to mutants mimicking their polymorphism. *Tissue Antigens* 48:509.
174. Villadangos, J. A. et al. 1994. Unusual topology of an HLA-B27 allospecific T cell epitope lacking peptide specificity. *J.Immunol.* 152:2317.
175. Pascolo, S. et al. 1997. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp.Med.* 185:2043.
176. Salter, R. D. et al. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 5:943.
177. Vazquez, M. N. et al. 2005. Similar cell surface expression of beta2-microglobulin-free heavy chains by HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 52:3290.
178. Rohrllich, P. S. et al. 2003. HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int.Immunol.* 15:765.
179. Lacroix, M. 2008. Persistent use of "false" cell lines. *Int.J.Cancer* 122:1.
180. García-Barreno, B. et al. 1988. Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res.* 9:307.
181. Parham, P. et al. 1978. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. *Nature* 276:397.
182. Ellis, S. A. et al. 1982. Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody. *Hum.Immunol.* 5:49.
183. Samino, Y. et al. 2006. A long N-terminal-extended nested set of abundant and antigenic major histocompatibility complex class I natural ligands from HIV envelope protein. *J.Biol.Chem.* 281:6358.
184. Kondo, E. et al. 2004. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* 103:630.
185. Wang, M. et al. 2007. CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 25:2823.
186. Ladell, K. et al. 2013. A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8+ T cells. *Immunity.* 38:425.
187. Lorente, E. et al. 2012. Multiple viral ligands naturally presented by different class I molecules in transporter antigen processing-deficient vaccinia virus-infected cells. *J.Virol.* 86:527.
188. Lorente, E. et al. 2012. Role of metalloproteases in vaccinia virus epitope processing for transporter associated with antigen processing (TAP)-independent human leukocyte antigen (HLA)-B7 class I antigen presentation. *J Biol.Chem.* 287:9990.

189. Firat, H. et al. 1999. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur.J.Immunol.* 29:3112.
190. Khare, S. D. et al. 1996. HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human beta2-microglobulin (beta2m) double transgenic mice with disrupted mouse beta2m. *J.Clin.Invest.* 98:2746.
191. Loirat, D. et al. 2000. Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J.Immunol.* 165:4748.
192. Gillis, P. A. et al. 2014. Development of a novel, guinea pig-specific IFN-gamma ELISPOT assay and characterization of guinea pig cytomegalovirus GP83-specific cellular immune responses following immunization with a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-vectored GP83 vaccine. *Vaccine* 32:3963.
193. Kumar, S. et al. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol.Biol.Evol.* 33:1870.
194. Infantes, S. et al. 2010. Multiple, non-conserved, internal viral ligands naturally presented by HLA-B27 in human respiratory syncytial virus-infected cells. *Mol.Cell.Proteomics* 9:1533.
195. Roberts, C. G. et al. 1996. Prediction of HIV peptide epitopes by a novel algorithm. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 12:593.
196. Herberts, C. A. et al. 2001. A measles virus glycoprotein-derived human CTL epitope is abundantly presented via the proteasomal-dependent MHC class I processing pathway. *J.Gen.Virol.* 82:2131.
197. Terajima, M. et al. 2008. Influenza A virus matrix protein 1-specific human CD8+ T-cell response induced in trivalent inactivated vaccine recipients. *J.Virol.* 82:9283.
198. Infantes, S. et al. 2011. Unusual viral ligand with alternative interactions is presented by HLA-Cw4 in human respiratory syncytial virus-infected cells. *Immunol.Cell Biol.* 89:558.
199. Rammensee, H. G. et al. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213.
200. Ruppert, J. et al. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74:929.
201. Barber, L. D. et al. 1995. Overlap in the repertoires of peptides bound in vivo by a group of related class I HLA-B allotypes. *Curr.Biol.* 5:179.
202. Lamb, R. A. 2013. Mononegavirales. In *Fields Virology*. pp. 881-882.
203. Homann, H. E. et al. 1990. Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* 177:131.
204. Tokusumi, T. et al. 2002. Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res.* 86:33.
205. Lorente, E. et al. 2013. Concerted in vitro trimming of viral HLA-B27-restricted ligands by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases. *PLoS One* 8:e79596.

206. Sesma, L. et al. 2005. Qualitative and quantitative differences in peptides bound to HLA-B27 in the presence of mouse versus human tapasin define a role for tapasin as a size-dependent peptide editor. *J.Immunol.* 174:7833.
207. Cragnolini, J. J. et al. 2008. Identification of endogenously presented peptides from *Chlamydia trachomatis* with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Mol.Cell Proteomics.* 7:170.
208. Alvarez-Navarro, C. et al. 2013. Novel HLA-B27-restricted epitopes from *Chlamydia trachomatis* generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J.Biol.Chem.* 25810-25.
209. Ramos, M. et al. 2002. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J.Biol.Chem.* 277:37573.
210. Jardetzky, T. S. et al. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353:326.
211. Schmidt, J. et al. 2011. Immunodominance of HLA-A2-restricted hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cell responses is linked to naive-precursor frequency. *J.Virol.* 85:5232.
212. Neumann-Haefelin, C. et al. 2010. Protective effect of human leukocyte antigen B27 in hepatitis C virus infection requires the presence of a genotype-specific immunodominant CD8⁺ T-cell epitope. *Hepatology* 51:54.
213. Hraber, P. et al. 2007. Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. *Hepatology* 46:1713.
214. Ziegler, S. et al. 2013. Susceptibility to chronic hepatitis C virus infection is influenced by sequence differences in immunodominant CD8⁺ T cell epitopes. *J.Hepatol.* 58:24.
215. Pereyra, F. et al. 2010. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330:1551.
216. Gao, X. et al. 2001. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N.Engl.J.Med.* 344:1668.
217. Kiepiela, P. et al. 2004. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769.
218. González-Galarza, F. F. et al. 2015. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 43:D784-D788.
219. Trachtenberg, E. et al. 2003. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat.Med.* 9:928.
220. Prugnolle, F. et al. 2005. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr.Biol.* 15:1022.
221. Vita, R. et al. 2015. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 43:D405-D412.
222. García-Medel, N. et al. 2014. Peptide handling by HLA-B27 subtypes influences their biological behavior, association with ankylosing spondylitis and susceptibility to endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1). *Mol.Cell Proteomics.* 13:3367.

223. Schittenhelm, R. B. et al. 2015. Revisiting the arthritogenic peptide theory: quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA-B27 allotypes. *Arthritis Rheumatol.* 67:702.
224. López, D. et al. 1992. Peptide-presenting similarities among functionally distant HLA-B27 subtypes revealed by alloreactive T lymphocytes of unusual specificity. *J.Immunol.* 148:996.
225. López, D. et al. 1994. Clonal analysis of alloreactive T cell responses against the closely related B*2705 and B*2703 subtypes. Implications for HLA- B27 association to spondyloarthritis. *J.Immunol.* 152:5557.
226. Poland, G. A. et al. 2007. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin.Pharmacol.Ther.* 82:653.
227. Wang, D. et al. 2012. Association of LMP/TAP gene polymorphisms with tuberculosis susceptibility in Li population in China. *PLoS.ONE.* 7:e33051.
228. Qiu, B. et al. 2012. Association of TAP1 and TAP2 polymorphisms with the outcome of persistent HBV infection in a northeast Han Chinese population. *Scand.J.Gastroenterol.* 47:1368.
229. Bronke, C. et al. 2013. HIV escape mutations occur preferentially at HLA-binding sites of CD8 T-cell epitopes. *AIDS* 27:899.
230. Timm, J. et al. 2015. Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Med.Microbiol.Immunol.* 204:29.
231. Sesma, L. et al. 2002. The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthritis (B*2704 and B*2706) differ by specific changes at three anchor positions. *J.Biol.Chem.* 277:16744.
232. Ramos, M. et al. 2002. Differential association of HLA-B*2705 and B*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J Biol.Chem.* 277:28749.
233. Marti, M. et al. 2001. Large sharing of T-cell epitopes and natural ligands between HLA-B27 subtypes (B*2702 and B*2705) associated with spondyloarthritis. *Tissue Antigens.* 58:351.
234. Montserrat, V. et al. 2003. Allospecific T cell epitope sharing reveals extensive conservation of the antigenic features of peptide ligands among HLA-B27 subtypes differentially associated with spondyloarthritis. *J.Immunol.* 170:5778.
235. García-Peydró, M. et al. 1999. High T cell epitope sharing between two HLA-B27 subtypes (B*2705 and B*2709) differentially associated to ankylosing spondylitis. *J.Immunol.* 163:2299.
236. Crotzer, V. L. et al. 2000. Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines. *J.Immunol.* 164:6120.
237. Fiorillo, M. T. et al. 1998. The naturally occurring polymorphism Asp116→His116, differentiating the ankylosing spondylitis-associated HLA-B-2705 from the non-associated HLA-B-2709 subtype, influences peptide-specific CD8 T cell recognition. *Eur.J.Immunol.* 28:2508.

238. Pazmany, L. et al. 1992. Genetic modulation of antigen presentation by HLA-B27 molecules. *J.Exp.Med.* 175:361.
239. Raghavan, M. et al. 1996. Extended repertoire of permissible peptide ligands for HLA-B*2702. *Protein Sci.* 5:2080.
240. Boisgerault, F. et al. 1996. Differences in endogenous peptides presented by HLA-B-2705 and B-2703 allelic variants - Implications for susceptibility to spondyloarthropathies. *J.Clin.Invest.* 98:2764.
241. García, F. et al. 1997. Lack of carboxyl-terminal tyrosine distinguishes the B*2706-bound peptide repertoire from those of B*2704 and other HLA-B27 subtypes associated with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 49:215.
242. Thomsen, M. et al. 2013. MHCcluster, a method for functional clustering of MHC molecules. *Immunogenetics* 65:655.
243. Herberts, C. A. et al. 2003. Dynamics of measles virus protein expression are reflected in the MHC class I epitope display. *Mol.Immunol.* 39:567.
244. Fortier, M. H. et al. 2008. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J.Exp.Med.* 205:595.
245. Juncker, A. S. et al. 2009. Systematic characterisation of cellular localisation and expression profiles of proteins containing MHC ligands. *PLoS.ONE.* 4:e7448.
246. Weinzierl, A. O. et al. 2007. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol.Cell Proteomics* 6:102.
247. Pudney, V. A. et al. 2005. CD8⁺ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J.Exp.Med.* 201:349.
248. Kastenmuller, W. et al. 2007. Cross-competition of CD8⁺ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J.Exp.Med.* 204:2187.
249. Meyer, V. S. et al. 2008. Long-term immunity against actual poxviral HLA ligands as identified by differential stable isotope labeling. *J.Immunol.* 181:6371.
250. Croft, N. P. et al. 2013. Kinetics of antigen expression and epitope presentation during virus infection. *PLoS.Pathog.* 9:e1003129.
251. Cherrie, A. H. et al. 1992. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J.Virol.* 66:2102.
252. Ball, L. A. et al. 1999. Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus. *J.Virol.* 73:4705.
253. Liang, B. et al. 2014. Chimeric bovine/human parainfluenza virus type 3 expressing respiratory syncytial virus (RSV) F glycoprotein: effect of insert position on expression, replication, immunogenicity, stability, and protection against RSV infection. *J.Virol.* 88:4237.
254. Chang, J. et al. 2002. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8⁺ T-cell effector activity and peripheral CD8⁺ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat.Med.* 8:54.

255. Mufson, M. A. et al. 1987. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J.Clin.Microbiol.* 25:1535.
256. Order - Mononegavirales. 2012. In *Virus Taxonomy*. pp. 653-657.
257. Carter, J. D. et al. 2010. The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 22:424.
258. Pal, S. et al. 2004. New murine model for the study of Chlamydia trachomatis genitourinary tract infections in males. *Infect.Immun.* 72:4210.
259. Khare, S. D. et al. 1998. Unraveling the mystery of HLA-B27 association with human spondyloarthropathies using transgenic and knock out mice. *Semin.Immunol.* 10:15.
260. Hammer, R. E. et al. 1990. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63:1099.
261. Weinreich, S. et al. 1995. HLA-B27 as a relative risk factor in ankylosing enthesopathy in transgenic mice. *Hum.Immunol.* 42:103.
262. Scofield, R. H. et al. 1993. A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthropathy: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:9330.
263. de Winter, J. J. et al. 2016. Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res.Ther.* 18:196.
264. Soroush, M. et al. 2016. Investigation of Cardiac Complications and their Incidence in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Med.Arch.* 70:35.
265. Gross, D. M. et al. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science* 281:703.
266. Matsumoto, I. et al. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 286:1732.
267. Ito, Y. et al. 2014. Detection of T cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science* 346:363.
268. Van de Water, J. et al. 1995. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp.Med.* 181:723.
269. Kita, H. et al. 2002. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J.Clin.Invest* 109:1231.
270. Frauendorf, E. et al. 2003. HLA-B27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides from B*2705 that are similar to bacteria-derived peptides. *Clin.Exp.Immunol.* 134:351.
271. Fiorillo, M. T. et al. 2000. CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J.Clin.Invest.* 106:47.
272. Atagunduz, P. et al. 2005. HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 52:892.

273. Singh, A. K. et al. 2013. Identification of immunogenic HLA-B*27:05 binding peptides of salmonella outer membrane protein in patients with reactive arthritis and undifferentiated spondyloarthritis. *J.Rheumatol.* 40:173.
274. Kuon, W. et al. 2001. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J.Immunol.* 167:4738.
275. Libert, C. et al. 2010. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat.Rev.Immunol.* 10:594.
276. Yurkovetskiy, L. et al. 2013. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity.* 39:400.
277. Markle, J. G. et al. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 339:1084.
278. Ngo, S. T. et al. 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol.* 35:347.
279. Voskuhl, R. 2011. Sex differences in autoimmune diseases. *Biol.Sex Differ.* 2:1.
280. Suhrbier, A. 2002. Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert.Rev.Vaccines.* 1:207.
281. Seyed, N. et al. 2011. In silico analysis of six known Leishmania major antigens and in vitro evaluation of specific epitopes eliciting HLA-A2 restricted CD8 T cell response. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 5:e1295.
282. Lorente, E. et al. 2016. Structural and non-structural viral proteins are targets of T-helper immune response against human respiratory syncytial virus. *Mol.Cell Proteomics.*
283. McLellan, J. S. et al. 2013. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 372:83.
284. Diez-Rivero, C. M. et al. 2012. CD8 T cell epitope distribution in viruses reveals patterns of protein biosynthesis. *PLoS.ONE.* 7:e43674.
285. Vaughan, K. et al. 2015. Analysis of human RSV immunity at the molecular level: learning from the past and present. *PLoS.ONE.* 10:e0127108.

XI. ANEXO

PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE ESTA TESIS

1. E. Lorente, R. García, C. Mir, **A. Barriga**, F. A. Lemonnier, M. Ramos, and D. López. 2012. Role of metalloproteases in vaccinia virus epitope processing for transporter associated with antigen processing (TAP)-independent human leukocyte antigen (HLA)-B7 class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 287:9990.
2. E. Lorente, S. Infantes, E. Barnea, I. Beer, **A. Barriga**, N. García-Medel, F. Lasala, M. Jiménez, A. Admon, and D. López. 2013. Diversity of natural self-derived ligands presented by different HLA class I molecules in transporter antigen processing-deficient cells. *PLoS ONE*. 8:e59118.
3. S. Infantes, E. Lorente, E. Barnea, I. Beer, **A. Barriga**, F. Lasala, M. Jiménez, A. Admon, and D. López. 2013. Natural HLA-B*2705 protein ligands with glutamine as anchor motif: implications for HLA-B27 association with spondyloarthritis. *J. Biol. Chem.* 288:10882.
4. E. Lorente, **A. Barriga**, C. Johnstone, C. Mir, M. Jiménez, and D. López. 2013. Concerted in vitro trimming of viral HLA-B27-restricted ligands by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases. *PLoS ONE*. 8:e79596.
5. D. López, E. Lorente, **A. Barriga**, C. Johnstone, and C. Mir. 2013. Vaccination and the TAP-independent antigen processing pathways. *Expert. Rev. Vaccines*. 12:1077.
6. **A. Barriga**, E. Lorente, C. Johnstone, C. Mir, M. Del Val, and D. López. 2014. A common minimal motif for the ligands of HLA-B*27 class I molecules. *PLoS ONE*. 9:e106772.
7. K. Nitschke, **A. Barriga**, J. Schmidt, J. Timm, S. Viazov, T. Kuntzen, A. Y. Kim, G. M. Lauer, T. M. Allen, S. Gaudieri, A. Rauch, C. M. Lange, C. Sarrazin, T. Eiermann, J. Sidney, A. Sette, R. Thimme, D. López, and C. Neumann-Haefelin. 2014. HLA-B*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J. Hepatol.* 60:22.
8. C. Johnstone, E. Lorente, **A. Barriga**, E. Barnea, S. Infantes, F. A. Lemonnier, C. S. David, A. Admon, and D. López. 2015. The viral transcription group determines the HLA class I cellular immune response against human respiratory syncytial virus. *Mol. Cell Proteomics*. 14:893.
9. E. Lorente, **A. Barriga**, E. Barnea, C. Mir, J. A. Gebe, A. Admon, and D. López. 2016. Structural and nonstructural viral proteins are targets of T-helper immune response against human respiratory syncytial virus. *Mol. Cell Proteomics*. 15:2141.